

Aus der Schering AG, Berlin,
Experimentelle Pharma Forschung, Endokrinpharmakologie

Leiter der Abteilung: Professor Dr. F. Neumann

FSH-BINDUNGSKAPAZITÄT IN HODENHOMOGENATEN VON RATTEN
IN ABHÄNGIGKEIT VOM LEBENSALTER
UND NACH BEHANDLUNG MIT STEROIDHORMONEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alpha Diallo
aus
Guinea

Berlin 1977
Journal-Nr. 912

Aus der Schering AG, Berlin,
Experimentelle Pharma Forschung, Endokrinpharmakologie

Leiter der Abteilung: Professor Dr. F. Neumann

FSH-BINDUNGSKAPAZITÄT IN HODENHOMOGENATEN VON RATTEN

IN ABHÄNGIGKEIT VOM LEBENSALTER

UND NACH BEHANDLUNG MIT STEROIDHORMONEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

eines Doktors der Veterinärmedizin

an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alpha Diallo

aus

Guinea

Berlin 1977

Journal-Nr. 912

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender des FBR: Prof. Dr. H.-H. Frey
Referent: Prof. Dr. F. Neumann
Korreferent: Prof. Dr. H. Weik



Tag der Promotion:

29. September 1977

INHALTSVERZEICHNIS

I.	<u>EINLEITUNG</u>	Seite 1
1.1	Hormonale Regulation der Spermatogenese, historischer Rückblick	1
1.2	Die Rolle des follikel-stimulierenden Hormons (FSH) in der Spermatogenese und Spermiogenese	5
1.3	Beeinflussung der Hodenfunktion durch Östrogene und Antiandrogene	13
1.4	Hormonale Regulation der Spermatogenese von Ratten von der Geburt bis zum Eintritt in die Pubertät (Androgen- und Gonadotropin- Serumspiegel)	15
1.5	Fragestellung der Arbeit	17
II.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	19
2.1	Tiermaterial	19
2.2	Untersuchung der FSH-Bindungskapazität im Hoden	19
2.3	Herstellung der Pufferlösungen und Gewinnung der Hodenhomogenate	21
2.3.1	Herstellung der Pufferlösungen	21
2.3.2	Gewinnung der Hodenhomogenate und der Blut- seren	22
2.4	Iodination von FSH	23
2.5	Bestimmung der ^{125}I -FSH-Bindungskapazität im Hoden	26
2.6	Berechnung der Meßeinheiten der Bindungs- kapazität	27
2.7	Bestimmung der spezifischen Bindungskapazität	27
2.8	Radioimmunologische Bestimmung der Serumblut- spiegel von FSH, LH und Testosteron	28

2.8.1	Prinzip des Radioimmunoassays	Seite 28
2.8.2	FSH-Bestimmung	31
2.8.3	Durchführung des FSH-Radioimmunoassays	32
2.8.4	Durchführung des Radioimmunotests für Testosteron	34
2.9	Hodenhistologie	37
2.9.1	Technik der Hodenhistologie	37
2.9.2	Histomorphometrische Untersuchungen am Hoden	39
2.10	Statistische Bearbeitung	39
III.	<u>ERGEBNISSE</u>	40
3.1	FSH-Bindungskapazität und Morphologie von Rattenhoden sowie Hormonprofile in Abhängigkeit vom Reifezustand (Lebensalter) der Tiere	40
3.1.1	Lebensalter und FSH-Bindungskapazität	40
3.1.2	Hodenmorphologie	40
3.1.3	Hodenmorphometrie (Durchmesser der Tubuli seminiferi)	48
3.1.4	Hormonprofile (Serumkonzentrationen von FSH, LH und Testosteron in den verschiedenen Reifestadien (Altersgruppen))	51
3.2	FSH-Bindungskapazität und Morphologie von Rattenhoden sowie Hormonprofile nach Behandlung mit Östradiolbenzoat	51
3.2.1	FSH-Bindungskapazität	51
3.2.2	Hodenmorphologie	55
3.2.3	Histomorphometrie (Durchmesser der Tubuli seminiferi)	55
3.2.4	Beeinflussung der Hoden-, Prostata- und Samen- blasengewichte	63
3.2.5	Hormonprofile (Serumkonzentrationen von FSH, LH und Testosteron)	63
3.3	FSH-Bindungskapazität und Morphologie von Rattenhoden sowie Hormonprofile nach Behandlung mit Cyproteronacetat	77

3.3.1	FSH-Bindungskapazität	Seite 77
3.3.2	Hodenmorphologie	77
3.3.3	Hodenmorphometrie (Durchmesser der Tubuli seminiferi)	81
3.3.4	Hormonprofile (Serumkonzentrationen von FSH, LH und Testosteron)	81
IV.	<u>DISKUSSION</u>	84
V.	<u>ZUSAMMENFASSUNG (SUMMARY)</u>	91
VI.	<u>LITERATUR</u>	96
VII.	<u>LEBENS LAUF</u>	113
VIII.	<u>DANKSAGUNG</u>	114

Vollständende grundlegende Ergebnisse wurden in den 30-er Jahren von RUTH (1930, 1932) an embryonalen Testes durchgeführte, wie überhaupt nur noch eine kleine folgende Aufzählung zu dieser Vorlesung die Testes mit Testosteron herangezogen werden.

Wegen des Hypophysenhormons sind zwei Verhältnisse zu nennen: einerseits von Weiden einwirkende Atrophie der Hoden auf, und die Spermatogenese hat zum Stillstand. Durch die Wirkung Hypophysenhormone Testes mit Hypophysenhormonen lässt sich die Atrophie verhindern. So nach der Hypophysenresektion die Spermatogenese einstellt, wird so gefördert die Spermatogenese auf, d.h. sekundäre Spermatozyten oder Spermatogonien II. Spermatiden und Spermatozoen fallen. Frühere Spermatozyten sind noch vorhanden, obwohl frühere Stadien

* Als Spermatogenese bezeichnet man die Gesamtvorgang der im Hoden ablaufenden Teilungsvorgänge, die Spermatogenese bezeichnet man die Bildung der Spermatiden zu Spermatozoen. Im deutschen Schrifttum werden beide Begriffe mitunter gleichbedeutend synonym benutzt.

I. E I N L E I T U N G

1.1 Hormonale Regulation der Spermatogenese - historischer Rückblick

Auf die Bedeutung der Hypophyse für die generative und inkretorische Hodenfunktion hat erstmals ASCHNER (1910) hingewiesen. Er hat u.a. einen zwei Monate alten Hund hypophysektomiert. Vierzehn Monate danach war "der Hoden nur noch halb so groß wie der des normalen Bruders und zeigte ein atrophisches Verhalten der Samenkanälchen". Am auffälligsten war die Depopulation des Keimepithels und das Fehlen reifer Spermatozoen sowie die Atrophie der Zwischenzellen.

Weiterführende grundlegende Experimente wurden in den 30-er Jahren von SMITH (1930, 1938) an erwachsenen Ratten durchgeführt, wie überhaupt für fast alle später folgenden Untersuchungen zu dieser Problematik Ratten als Versuchstiere herangezogen wurden.

Nach der Hypophysektomie fiel eine verhältnismäßig rasche, innerhalb von Wochen eintretende Atrophie der Hoden auf, und die Spermatogenese kam zum Stillstand*. Durch Substitution hypophysektomierter Ratten mit Hypophysenextrakten ließ sich die Atrophie verhindern. Da nach der Hypophysektomie die Reifeteilung ausbleibt, hört zu allererst die Spermiogenese auf, d.h. sekundäre Spermatozyten oder Spermatozyten II, Spermatiden und Spermatozoen fehlen. Primäre Spermatozyten sind noch vorhanden, ebenso frühere Stadien

* Als Spermatogenese bezeichnet man den Gesamtvorgang der im Hoden ablaufenden Teilungsprozesse, als Spermiogenese bezeichnet man die Reifung der Spermatiden zu Spermatozoen. Im deutschen Schrifttum werden beide Begriffe mitunter fälschlicherweise synonym benutzt.

der Spermatogenese, wenn auch in stark reduzierter Zahl (TONUTTI 1955). Bei anderen Spezies sind die Auswirkungen der Hypophysektomie auf die Hodenfunktion ähnlich wie bei der Ratte. Dies gilt auch für den Mann.

GREEP und Mitarbeiter konnten dann in der zweiten Hälfte der 30-er Jahre (1936, 1937) wahrscheinlich machen, daß es zwei verschiedene Hypophysenhormone sind, die die inkretorische und generative Hodenfunktion regulieren, nämlich FSH (follikelstimulierendes Hormon) und ICSH* (interstitiellzell-stimulierendes Hormon). Auf Grund ihrer Untersuchungen postulierten GREEP und FEVOLD (1937) sowie GREEP und Mitarbeiter (1936), daß das LH die Funktion der Leydig'schen Zwischenzellen reguliert, während FSH die Spermatogenese unterhält, also auf die Tubuli seminiferi wirkt. Dieses Konzept der hormonalen Regulation der Hodenfunktion, das sich auch heute noch in vielen gängigen Lehrbüchern findet, war bald weniger klar, als nämlich eine ganze Reihe von Untersuchern fanden, daß es bei hypophysektomierten Tieren möglich ist, durch alleinige Androgensubstitution die Spermatogenese und Spermiogenese - und damit auch die Fertilität - aufrechtzuerhalten.

Als erste haben 1937 WALSH und Mitarbeiter berichtet, daß es durch Substitution hypophysektomierter Tiere mit androgenhaltigen Urinextrakten gelingt, die Spermatogenese aufrechtzuerhalten. Diese Befunde wurden dann unter Verwendung reiner Androgene vielfach bestätigt, auch an anderen Spezies wie Mäusen, Kaninchen, Hunden und Affen (CUTULY & CUTULY 1940; GAARENSTROOM 1939; GAARENSTROOM & DE JONGH

Die Bezeichnung LH (Luteinisierungshormon) wurde erst später bevorzugt benutzt. Aber auch noch heute werden die Begriffe LH und ICSH synonym angewandt. In dieser Arbeit wurde der Terminus LH benutzt.

1946; LEATHEM 1942; LEATHEM 1944; NELSON 1941; NELSON & MERCKEL 1937; SELYE & FRIEDMAN 1941; ZAHLER 1939; SELYE 1940; WELLS 1942; VAN WAGENEN & SIMPSON 1954).

Den endgültigen Beweis für die direkt spermatogene Wirkung der Androgene schienen Untersuchungen zu liefern, in denen Androgenpellets oder Kristalle direkt in den Hoden hypophysektomierter oder Östrogen-behandelter Tiere implantiert wurden, wobei sich lokal der positive Effekt der Androgene auf die Spermatogenese zeigte (ZAHLER 1944; JAGGARD & BRADBURY 1961; HOHLWEG, DÖRNER & KOPP 1961; HOHLWEG & ZAHLER 1946).

Angeregt durch diese experimentellen Befunde über die lokale spermatogene Wirkung von Androgenen hat man sogar in der Humanmedizin in Fällen von Hypogonadismus versucht, dieses Prinzip - die intratestikuläre Androgenapplikation - therapeutisch auszunutzen. In manchen Fällen wurden die Ehefrauen der in dieser Art behandelten Männer auch gravid (BURONI 1951; GADERMANN 1950; SCHENNETTEN 1948; SCHUERMANN 1951; SEITZ 1949; SCHNEIDER & HOHLWEG 1950; SCHOELLER, DOHRN & HOHLWEG 1936). Es konnte sogar gezeigt werden, daß nicht nur Androgene, sondern auch eine ganze Reihe anderer Steroide mit fehlenden oder nur sehr schwach ausgeprägten androgenen Eigenschaften spermatogen wirken, wie z.B. Progesteron, 17 α -Hydroxyprogesteron, Pregnenolon, Androstendion, Dehydroepiandrosteron (Übersicht s. bei NEUMANN, STEINBECK & VON BERSWORDT-WALLRABE 1967; SELYE & FRIEDMAN 1941).

Letztlich wirken alle Steroidhormone spermatogen, die in der Biosynthesekette des Testosterons vorkommen, und ganz offensichtlich ist der Hoden auch in Abwesenheit gonadotroper Hormone in der Lage, aus Vorläufern (Prekursoren) biologisch aktive Androgene zu synthetisieren. Für diese heute als erwiesen geltende Ansicht spricht auch der Befund, daß die spermatogene Wirkung von Substanzen, wie etwa Progesteron, durch gleichzeitige Gabe eines Antiandrogens

(Cyproteronacetat) aufhebbar ist. Durch das Antiandrogen wird nicht die Wirkung des Progesterons als solches aufgehoben, vielmehr die Wirkung der aus Progesteron im Hoden synthetisierten Androgene (NEUMANN, STEINBECK & VON BERSWORT-WALLRABE 1967).

Auf Grund dieser Befunde (Aufrechterhaltung der Spermatogenese durch Androgene allein) war die Rolle des FSH völlig unklar, denn wenn nur Androgene für den normalen Ablauf der Spermatogenese und Spermiogenese erforderlich sind und die Androgenbiosynthese in den Leydig'schen Zwischenzellen unter physiologischen Bedingungen nur durch das hypophysäre LH gesteuert wird, dann bleibt für das FSH keine physiologische Funktion. Diese Anschauung wurde vor allem von HOHLWEG vertreten (s. Übersicht bei HOHLWEG 1961).

Es war zunächst völlig unverständlich, warum Androgene - an intakte Individuen verabfolgt - die Spermatogenese hemmen, obwohl sie doch an hypophysektomierten Tieren einen positiven Einfluß ausüben. Dieses Phänomen - die sogenannte hodenschädigende Wirkung von Androgenen - wurde bereits 1932 von MOORE und PRICE beschrieben, die mit Ratten arbeiteten, und später immer wieder auch an anderen Spezies (DISCHREIT 1939; GREENE & BURRILL 1940; LUDWIG 1950; RÖSSLE & ZAHLER 1938; RUBINSTEIN & KURLAND 1941; ZAHLER 1947a; ZAHLER 1947b; YASUDA & JOHNSON 1965) und auch beim Manne (GETZOFF 1955; HECKEL & MC DONALD 1952a; HECKEL & MC DONALD 1952b; HECKEL, ROSS & KESTEL 1951; TONUTTI, WELLER, SCHUCHARTH & HEINKE 1960; HELLER, NELSON, HILL, HENDERSON, MADDOCK, JUNGCK, PAULSEN & MORTIMORE 1950a; HELLER, NELSON, HILL, HENDERSON, MADDOCK & JUNGCK 1950b; HOTCHKISS 1944; HERCHEN 1954) bestätigt.

Bereits MOORE und PRICE (1932) hatten vermutet, daß die hodenschädigende Wirkung der Androgene über eine Hemmung der gonadotropen Partialfunktion der Hypophyse zustande kommt.

Dies hat sich dann bestätigt, allerdings ist es weniger die Hypophyse, sondern ein - erstmals von HOHLWEG und JUNKMANN (1932) postuliert - höheres neurales Zentrum, an dem Steroide ihre negative Feedback-Wirkung ausüben.

Ganz offensichtlich ist der Androgenbedarf für androgen-abhängige Vorgänge im Hoden selbst um ein vielfaches höher als der Androgenbedarf anderer androgenabhängiger Organe, wie etwa der akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Unter physiologischen Bedingungen sind am Synthesort der Androgene, also im Hoden selbst, die Androgenkonzentrationen auch 80 bis 100 mal höher als im Serum (Untersuchungen der Abteilung Endokrinpharmakologie der SCHERING AG, unpubliziert). Durch exogene Zufuhr von Androgenen lassen sich derartig hohe Androgenkonzentrationen kaum erzielen, allenfalls bei Gabe von fast toxikologischen Dosen. Da aber bereits physiologische Androgendosen die LH-Sekretion und damit die endogene Testosteronproduktion der Leydig'schen Zwischenzellen hemmen, wird damit die hodenschädigende Wirkung der Androgene verständlich. Sie beruht auf einem relativen intratestikulären Androgendefizit. Es ist also durchaus kein Widerspruch, daß Androgene einerseits spermatogen, also positiv auf die Spermatogenese wirken, und andererseits die Spermatogenese zu hemmen vermögen. Es hängt von der Dosis und von der Ausgangssituation (intakte oder hypophysektomier-te Tiere) ab, welcher Effekt dominiert.

Nach wie vor blieb aber unklar, welche physiologische Bedeutung das follikel-stimulierende Hormon für den Vorgang der Spermatogenese oder die Hodenfunktion hat.

1.2 Die Rolle des follikel-stimulierenden Hormons (FSH) in der Spermatogenese und Spermiogenese

Wie im vorangegangenen Abschnitt ausgeführt, war lange umstritten, ob überhaupt und - wenn ja - wo das follikel-stimulierende Hormon im Hoden angreift. Einige Schlüsse konnten

aus Substitutionsversuchen hypophysektomierter Ratten mit Gonadotropinen gezogen werden. Die Interpretation der Ergebnisse geschah jedoch nicht in allen Fällen mit der notwendigen Zurückhaltung, denn bis vor kurzem standen keine hochgereinigten Gonadotropin-Präparate zur Verfügung. HCG (human chorionic gonadotrophin), das in aller Regel für derartige Untersuchungen benutzt wurde, besaß wohl vorwiegend LH-Aktivitäten, war aber nicht völlig frei von FSH-Verunreinigungen.

FSH-Präparate, auch solche, die als hochgereinigt bezeichnet wurden, besaßen immer noch LH-Aktivitäten.

PMS (pregnant mare serum gonadotrophin) besitzt sowohl LH- als auch FSH-Aktivitäten.

Wohl die umfangreichsten derartigen Untersuchungen wurden von WOODS und SIMPSON (1961) durchgeführt. Sie konnten zeigen, daß verhältnismäßig niedrige Dosen von LH die Spermatogenese bei hypophysektomierten Ratten bis zu einem gewissen Grade aufrechterhalten, wenn die Behandlung unmittelbar im Anschluß an die Hypophysektomie erfolgt. Andererseits gelang es aber auch mit extrem hohen LH-Dosen nicht, die Abnahme der Hodengewichte zu verhindern. Mit FSH, allein verabfolgt, gelang die Erhaltung der Spermatogenese nur in extrem hohen Dosen. Mittlere Dosen, ohne nennenswerte LH-Aktivitäten, waren fast wirkungslos.

Am besten gelang die Aufrechterhaltung der Spermatogenese durch Gabe von FSH und LH (HCG). Selbst so niedrige Dosen, die - jeweils allein verabfolgt - unwirksam waren, hielten die Spermatogenese - in Kombination verabfolgt - aufrecht. Daraus schlossen WOODS und SIMPSON (1961), daß die Spermatogenese und Spermiogenese FSH- und LH-(androgen)abhängig sind und daß beide tropen Hormone synergistisch wirken.

Liegt zwischen der Hypophysektomie und dem Beginn der Substitution mit tropen Hormonen eine längere (2 bis 3 Wochen) Involutionsperiode, dann gelingt es weder mit LH noch mit FSH - allein verabfolgt - die Spermatogenese zu reinitiierten.

Es gelingt nur durch Substitution mit beiden Gonadotropinen (LOSTROH 1963; BOCCABELLA 1963; GAARENSTROOM & DE JONGH 1946).

VON BERSWORDT-WALLRABE und NEUMANN (1968) ist es bei Ratten sogar gelungen, selbst nach einjähriger Involutionsperiode durch Behandlung mit PMS (100 IU/100 g KG/tägl.), das sowohl LH- als auch FSH-Aktivitäten besitzt, die Spermatogenese zu reinitiiieren.

Diese und andere Versuche legten die Vermutung nahe, daß dem FSH unter physiologischen Bedingungen eine wesentliche Rolle für den normalen Ablauf der Spermatogenese zukommt.

Es gab jedoch auch Untersuchungen, die dagegen sprachen. CLERMONT und HARVEY (1967) untersuchten quantitativ histologisch den Einfluß von Gonadotropinen auf das Keimepithel hypophysektomierter Ratten und kamen zu dem Schluß, daß FSH keinen direkten Effekt auf das Keimepithel hat, sondern lediglich durch seine Verunreinigungen mit LH-Aktivitäten über eine Stimulierung der Zwischenzellfunktion - und damit der Androgenbiosynthese - mäßig spermatogen wirkt.

Zu einer ähnlichen Aussage kamen VON BERSWORDT-WALLRABE und NEUMANN (1966) bei einem ganz anderen experimentellen Ansatz. Hypophysektomierte Ratten wurden mit bovinem FSH und einem Antiandrogen (Cyproteronacetat) behandelt. Durch das Antiandrogen wurde quasi indirekt die ICSH-Verunreinigung (die durch ICSH stimulierten Androgene können keine Wirkung entfalten) ausgeschaltet. Unter diesen Bedingungen ließ sich kein positiver Effekt des FSH nachweisen.

LEBLOND und Mitarbeiter (1963) vermuteten dagegen, daß FSH an den Typ A - Stammzellen angreift und für die Stammzellen-erneuerung essentiell ist.

STEINBERGER und DUCKETT (1965) unterscheiden zwischen der Initiiierung und der Aufrechterhaltung der Spermatogenese. Bei Ratten, bei denen von Geburt an die Gonadotropinsekre-

tion durch chronische Behandlung mit einem Östrogen gehemmt war, lief die erste Welle der Spermatogenese normal ab, und zwar bis zu den pachytänen Spermatocyten, d.h. eine Reifeteilung erfolgte nicht.

Wurden die Tiere neben Östrogenen zusätzlich noch mit einem Androgen behandelt, dann lief die Reifeteilung ab, denn es traten Spermatiden auf. Allerdings war die Spermatidenreifung - also die Spermiogenese - unvollständig, sie ging nur bis Schritt 15 bis 16. Erst wenn solche Tiere PMS erhielten, war die Spermiogenese vollständig. STEINBERGER und DUCKETT (1965) vermuteten daher, daß FSH für die Spermatidenreifung von Bedeutung ist. Die von diesen Autoren entwickelte Vorstellung der hormonalen Regulation der Spermatogenese ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Noch bis vor kurzem fand sich dieses Schema in Lehr- und Handbüchern, denn immer noch waren letztlich alle Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des FSH in der Spermatogenese sehr widersprüchlich und uneinheitlich. Auch in vitro Untersuchungen zur hormonalen Regulation der Spermatogenese ließen keine klaren Schlüsse zu (STEINBERGER 1967; STEINBERGER & STEINBERGER 1965; STEINBERGER & STEINBERGER 1966; STEINBERGER & STEINBERGER 1969).

Heute kann als so gut wie gesichert gelten, daß das Zielorgan für FSH die Sertolizellen sind. Als erster hat diese Vermutung wohl MURPHY (1965) ausgesprochen.

MURPHY hat immaturen hypophysektomierten Ratten FSH intratestikulär verabfolgt und beobachtete bereits einen Tag später eine Hypertrophie der Sertolizellen und eine erhöhte sekretorische Aktivität. Über die Sekretionsprodukte der Sertolizellen war damals noch nichts bekannt.

Auch LOSTROH (1970) vertrat die Auffassung, daß FSH zumindest für die Entwicklung der Sertolizellen von Bedeutung sei. Er hat ebenfalls mit immaturen Ratten gearbeitet. CASTRO und Mitarbeiter (1970) sowie MANCINI et al. (1967) haben mit Ferritin markiertes FSH erwachsenen Ratten inji-

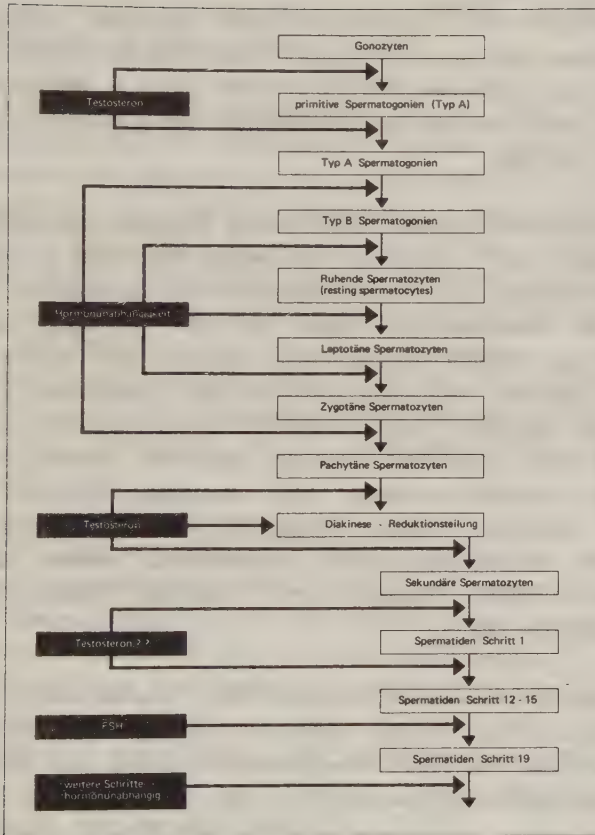


Abb. 1 Schema der hormonalen Regulation der Spermatogenese
(nach STEINBERGER & DUCKETT 1965)

ziert und fanden in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen Ferritin-Partikel gehäuft im Cytoplasma von Sertolizellen. Unter Anwendung mehr spezifischer Methoden (fluoreszierende Antikörper) konnte dieser Befund bestätigt werden (CASTRO, ALONSO & MANCINI 1972).

Schließlich ist es inzwischen auch gelungen, spezifische Rezeptoren für das follikel-stimulierende Hormon in Sertolizellen nachzuweisen (Übersicht dazu s. MEANS 1975). Darauf soll aber in der DISKUSSION detaillierter eingegangen werden.

Die Auffindung eines spezifischen Transportproteins für Androgene (ABP = androgen-bindendes Protein) im Hoden und Nebenhodenkopf und Untersuchungen zur hormonalen Regulation der ABP-Sekretion durch die Arbeitsgruppen um HANSSON, RITZÉN und FRENCH ließen keine Zweifel mehr daran, daß die Sertolizellen Zielorgan für FSH sind (Übersicht dazu s. HANSSON, RITZÉN, FRENCH & NAYFEH 1975; HANSSON, RITZÉN & FRENCH 1976; HANSSON, PURVIS, CALANDRA, FRENCH, KOTITE, NAYFEH, RITZÉN & HAGENÄS 1976; HANSSON, TRYGSTAD & RITZÉN 1974; HANSSON, FRENCH, WEDDINGTON, NAYFEH & RITZÉN 1974; HANSSON, WEDDINGTON, NAESS, ATTRAMADAL, FRENCH, KOTITE, NAYFEH, RITZÉN & HAGENÄS 1975; HANSSON, FRENCH, TRYGSTAD & TORGENSEN 1973).

Das androgen-bindende Protein (ABP) bindet aktiv Androgene und wird in die Tubuli seminiferi sezerniert. Es besorgt den aktiven Transport der Androgene durch die Blut-Hodenschranke und sorgt so für die Aufrechterhaltung der erforderlich hohen Androgenspiegel in den Tubuli seminiferi und im Nebenhodenkopf, wo Reifungsprozesse an den Spermatozoen ablaufen.

Den Beweis dafür, daß das ABP ein Sekretionsprodukt der Sertolizellen ist, haben inzwischen eine ganze Reihe von Untersuchern erbracht. Auch bei völliger Zerstörung des Keimepithels - etwa mittels Röntgenstrahlen vor der Geburt - ändert sich der ABP-Gehalt im Hoden und Nebenhodenkopf

nicht. (Darauf wird in der DISKUSSION näher eingegangen.)

Nach der Hypophysektomie sinkt der ABP-Gehalt rasch ab. Zehn Tage nach der Hypophysektomie ist dieses Transportprotein nicht mehr nachweisbar (HANSSON, REUSCH, TRYGSTAD, TORGERSEN, RITZÉN & FRENCH 1973).

Behandlung mit FSH, nicht aber mit LH, führt zu einem Wiederanstieg der ABP-Konzentrationen. Durch Androgensubstitution gelingt es bei hypophysektomierten Ratten ebenfalls, den der Hypophysektomie folgenden Abfall des ABP zu verhindern. Androgene sind jedoch wirkungslos, wenn eine längere Involutionsperiode zwischen der Hypophysektomie und dem Behandlungsbeginn liegt. Nur FSH vermag dann die ABP-Produktion wieder zu stimulieren.

Dieser Befund spricht dafür, daß das FSH zumindest für die Initiierung der Spermatogenese in der Pubertät von Bedeutung ist (Übersicht dazu s. HANSSON, RITZEN, FRENCH & NAYFEH 1975).

HANSSON und Mitarbeiter (1975) entwickelten auf Grund ihrer Untersuchungen ein neues Konzept der hormonalen Regulation der Spermatogenese, das vielleicht gerade wegen seiner Einfachheit plausibel ist (s. dazu Abbildung 2).

LH stimuliert die Androgenbiosynthese in den Leydig'schen Zwischenzellen; FSH unterhält allein - oder im Zusammenwirken mit Androgenen - die sekretorische Aktivität der Sertolizellen. ABP sorgt für ein hohes androgenes Milieu im Hoden und Nebenhodenkopf*.

* Am Rande sei hier angemerkt, daß es neben dem ABP noch ein weiteres Sekretionsprodukt der Sertolizellen gibt, nämlich das Inhibin. Man nimmt heute an, daß die Regulation der hypophysären FSH-Sekretion durch ein nicht-steroidales Hormon des Hodens geschieht. Inhibin ist wahrscheinlich ein Proteohormon, mit einem Molekulargewicht um 20.000. Es greift wahrscheinlich direkt an der Hypophyse an und nicht am Hypothalamus. Inhibinaktivitäten wurden in Bullenhodenextrakten, in der Follikelflüssigkeit von Rindern und im Seminalplasma von Männern nachgewiesen.

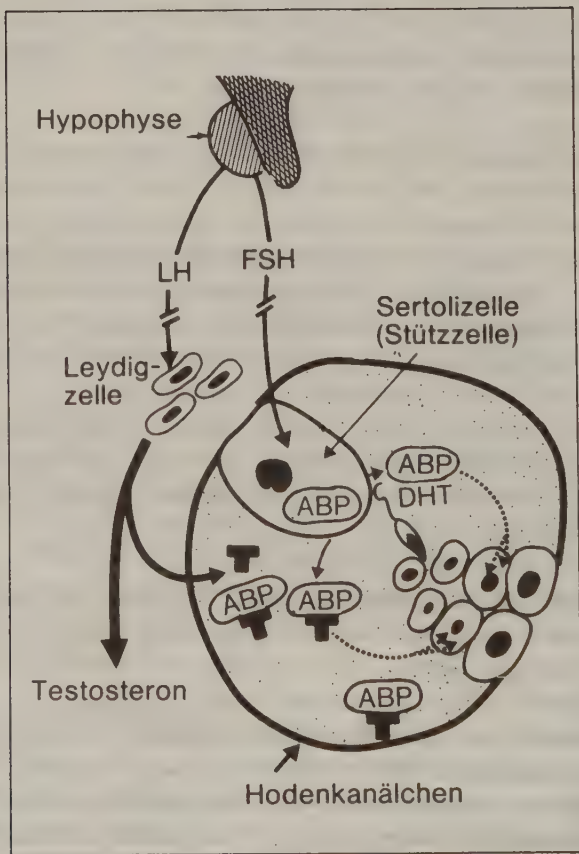


Abb. 2 Schema der hormonalen Regulation der Spermatogenese (nach HANSSON et al. 1975)

1.3 Beeinflussung der Hodenfunktion durch Östrogene und Anti-androgene

Ö s t r o g e n e :

Die Östrogenzufuhr führt über eine Hemmung der hypophysären Gonadotropinsekretion - und damit Hemmung der LH-abhängigen testikulären Androgenbiosynthese - zu einer Atrophie der Hoden. Der Effekt ist mit dem einer Hypophysektomie vergleichbar und bei allen Spezies - einschließlich des Mannes - ähnlich (MOORE & PRICE 1932; PALLOS 1941; STEINBERGER & NELSON 1955; LYNCH 1952; NEUMANN, DIALLO, HASAN, SCHENCK & TRAORE 1976; HECKEL & STEINMETZ 1941; BALZE, MANCINI, BUR & IRAZU 1954; SCHWARTZ 1945).

Die Ausschaltung der inkretorischen Hodenfunktion durch Östrogene gehört zur Standardtherapie des Prostata-Karzinoms (Übersicht dazu s. SENGE, NEUMANN & RICHTER 1975).

Verschiedentlich wurde vermutet, daß Östrogene nicht nur via Hemmung der Gonadotropinsekretion zu einer Hodenatrophie führen, sondern auch direkt schädigend auf das Keim-epithel wirken. Man hat die direkte Wirkung von Östrogenen auf den Hoden auf eine Hemmung der an der Androgenbiosynthese beteiligten Enzyme zurückgeführt (SAMUEL & EIK-NES 1968).

In in vitro Untersuchungen bei Inkubation von Hodengewebe von mit östrogen-vorbehandelten Ratten war die Umwandlung von C₂₁-Steroiden in Androgene gehemmt. Auch der Nachweis von Östrogenrezeptoren in den Leydigzellen sprach für einen direkten Angriffspunkt der Östrogene am Hoden (SAR, STUMPF, MC LEAN, SMITH, HANSSON, NAYFEH, FRENCH 1975). Darauf wird in der DISKUSSION noch einmal eingegangen.

Die meisten Untersuchungen sprachen aber gegen einen direkten Angriffspunkt der Östrogene. So sind durch intratestikuläre (HOHLWEG, DÖRNER & KOPP 1961) oder systemische (STEINBERGER & STEINBERGER 1969) Androgensubstitution alle

Östrogen-Effekte aufhebbar. Es besteht auch kein direkter Östrogen/Androgen-Antagonismus (NEUMANN, ELGER, STEINBECK & VON BERSWORDT-WALLRABE 1968).

A n t i a n d r o g e n e :

Nur solche Antiandrogene beeinflussen die Spermatogenese, die neben antiandrogenen noch zusätzlich gestagene und damit antigonadotrope Eigenschaften besitzen. Sogenannte reine Antiandrogene - wie z.B. Cyproteron und das nicht-steroidale Flutamid - haben keinen nennenswerten Effekt auf die generative Hodenfunktion (Übersicht dazu s. NEUMANN & STEINBECK 1974; NEUMANN, GRÄF, HASAN, SCHENCK & STEINBECK 1976).

Dagegen konnte nach Behandlung mit Antiandrogenen vom Typ des Cyproteronacetats - mit Ausnahme des Hamsters* - bei allen untersuchten Spezies eine Hemmung der Spermatogenese - und damit Sterilität - nachgewiesen werden (GRÄF, BROTHERTON & NEUMANN 1974; MORSE, LEACH, ROWLEY & HELLER 1973; NEUMANN & STEINBECK 1974; NEUMANN, GRÄF, HASAN, SCHENCK & STEINBECK 1976; OTT 1968; OTT & HOFFET 1968).

Es hängt von der Empfindlichkeit der betreffenden Spezies bzw. von den angewandten Dosen ab, auf welcher Stufe der Arrest der Spermatogenese erfolgt. Bei niedrigen Dosen bzw. bei Spezies wie etwa der Ratte, die wenig empfindlich auf Cyproteronacetat ansprechen, ist im allgemeinen nur die Spermiogenese tangiert. Nur bei extrem hohen Dosen unterbleibt die Reifeteilung.

* Bei der Spezies Hamster besitzt Cyproteronacetat keine antigonadotropen Eigenschaften und ist nicht gestagen. Es verhält sich also wie Cyproteron und Flutamid bei anderen Spezies.

Bei Spezies wie etwa dem Hund, kommt es bereits bei Tagesdosen von 10 mg/kg KG/oral zur Hemmung der Reifeteilung (NEUMANN, RICHTER & GÜNZEL 1965).

Nach Langzeitbehandlung mit hohen Dosen entspricht das Hodenbild fast dem nach einer Hypophysektomie. Manchmal sind in den Tubuli seminiferi neben Sertolizellen nur noch Spermatogonien und frühe Spermatidenformen zu beobachten, allenfalls treten noch vereinzelt pachytäne Spermatozyten auf (NEUMANN, GRÄF, HASAN, SCHENCK & STEINBECK 1976). Ähnlich sind die Befunde bei Männern (OTT 1968; MORSE, LEACH & ROWLEY 1973; PETRY, MAUSS, RAUSCH-STROOMANN & VERMEULEN 1972; KOCH, LORENZ, DANEHL, ERICSSON, HASAN, KEYSERLINGK, LÜBKE, MEHRING, RÖMMLER, SCHWARTZ & HAMMERSTEIN 1976; Übersicht s. bei RASPÉ 1972; HORN 1972).

Bis vor kurzem war nicht geklärt, worauf die spermatogenesehemmende Wirkung des Cyproteronacetats beruht. Denkbar sind nämlich zwei Möglichkeiten. Erstens könnte Cyproteronacetat direkt am Hoden wirken und auf Grund seiner Antiandrogenität zu einem relativen Androgendefizit führen; zweitens könnte der Hemmeffekt auf der antigonadotropen Wirksamkeit des Cyproteronacetats beruhen. Damit schließt die eine Möglichkeit die andere nicht aus. Die eigenen durchgeführten Untersuchungen sollten mit dazu beitragen, diese Frage zu beantworten.

1.4 Hormonale Regulation der Spermatogenese von Ratten von der Geburt bis zum Eintritt in die Pubertät (Androgen- und Gonadotropin-Serumspiegel)

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgelegten eigenen Untersuchungen befaßt sich mit der FSH-Bindungskapazität, der Morphologie von Rattenhoden sowie den Hormonprofilen von Testosteron, FSH und LH in Abhängigkeit vom Reifezustand (Lebensalter) von Ratten. Als diese Untersuchungen begonnen wurden, gab es in der Literatur kaum Angaben über Hormon-

profile vor der Pubertät. Erst mit der Etablierung der hochsensitiven Radioimmunoteste konnten derartige Untersuchungen durchgeführt werden.

Spätestens 1903 hat man vermutet, daß schon der foetale Hoden endokrin aktiv ist (BOUIN & ANCEL 1903).

BOUIN und ANCEL (1903) beobachteten nämlich bei 30 mm langen Schweinen-Embryonen recht gut entwickelte Leydig'sche Zwischenzellen, und da in dieser Phase die männliche Sexualdifferenzierung abläuft, lag es nahe zu vermuten, daß es Hormone (Androgene) des foetalen Hodens sind, die an der Steuerung der männlichen Sexualdifferenzierung beteiligt sind.

Seit den als klassisch anzusehenden Untersuchungen von PFEIFFER (1936) weiß man, daß in den ersten Lebenstagen in der Gonade männlicher Ratten synthetisierte Androgene von allergrößter Bedeutung sind für die Prägung neuraler Zentren zum männlichen Funktionstyp (Modus der Gonadotropinsekretion, männliches Sexualverhalten und eine Reihe anderer geschlechtsunterschiedlicher Verhaltensweisen). Inzwischen konnten diese Beobachtungen durch direkte Bestimmung der Androgenkonzentrationen in den Gonaden oder im Serum belegt werden.

Die FSH-Serumspiegel sind in der Neonatalperiode von Ratten überraschend hoch. Bei 15 Tage alten Tieren wurden bereits 500 ng/ml gemessen* (GOLDMAN, GRAZIA, KAMBERI & PORTER 1971; OJEDA & RAMIREZ 1972). Die höchsten FSH-Werte fand man bei 30 bis 35 Tage alten Ratten (SWERDLOFF, WALSH, JACOBS & ODELL 1971). Danach fallen die Werte wieder ab.

* Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, beginnt genau um diese Zeit herum die Reifeteilung und damit der Vorgang der Spermiogenese. Dies wird auch erkennbar an einer dramatischen Gewichtszunahme der Hoden und am histologischen Hodenbild.

DÖHLER und WUTTKE (1974) fanden in ihren Untersuchungen Höchstwerte zwischen dem 10. und 21. Lebenstag. Danach fielen die Werte ab, um präpuberal wieder anzusteigen (37. bis 43. Tag). Die präpuberalen FSH-Werte lagen über dem Erwachsenen-Blutspiegel.

Die Plasma-LH-Spiegel sind ebenfalls neonatal verhältnismäßig hoch, um dann am Tag 12 bis 15 ein Minimum zu erreichen (OJEDA & RAMIREZ 1972). Danach steigen sie kontinuierlich an, um um den Tag 70 herum mit etwa 0.8 ng/ml Maximalwerte zu erreichen (SWERDLOFF, WALSH, JACOBS & ODELL 1971). Zu diesem Zeitpunkt sind die akzessorischen Geschlechtsdrüsen auch fast maximal entwickelt.

DÖHLER und WUTTKE (1974) fanden Höchstwerte im Präpuberalstadium zwischen dem Tag 37 und 43.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die vorgelegten eigenen Untersuchungen sollten in erster Linie dazu dienen, einen Beitrag zur physiologischen Bedeutung des FSH, vor allem für die Initiierung der Spermatogenese, zu liefern. Zu diesem Zweck wurde die FSH-Bindungskapazität in Rattenhodenhomogenaten - in Abhängigkeit vom Lebensalter der Tiere - untersucht. Außerdem wurden Hormonprofile für LH, FSH und Testosteron erstellt, um zu untersuchen, ob Korrelationen bestehen zwischen der FSH-Bindungskapazität einerseits und den Serumhormonspiegeln der genannten Hormone andererseits. Die Befunde wurden durch lichtmikroskopische Untersuchungen am Hoden abgerundet.

Davon ausgehend, daß FSH die sekretorische Aktivität der Sertolizellen reguliert und daß von der FSH-abhängigen Produktion des androgen-bindenden Proteins (ABP) die intratestikuläre Androgenkonzentration abhängig ist, sollte die Frage geklärt werden, ob die spermatogenese-hemmende Wirkung von Steroiden auf eine Beeinflussung der Sertolizell-

funktion beruhen könnte. Untersucht wurden Östradiol und das Antiandrogen Cyproteronacetat. Neben der FSH-Bindungs-
kapazität von Rattenhodenhomogenaten wurden diese Unter-
suchungen ergänzt durch Ermittlung der Serumblutspiegel
für FSH, LH und Testosteron sowie durch die Beurteilung
der Hodenmorphologie. Auch die Organgewichte der Hoden und
der akzessorischen Geschlechtsdrüsen wurden mitverfolgt.

II.

M A T E R I A L und M E T H O D E N

2.1 Tiermaterial

Alle Untersuchungen wurden an Wistar-Ratten der Firma BRÜNGER durchgeführt. Die Ratten wurden in den Laboratorien der SCHERING AG gehalten. Sie wurden mit Altrumin^R der Firma ALTROGGE gefüttert und erhielten Leitungswasser ad libitum.

Gruppeneinteilung :

- (1) Ratten im Alter von 14, 20, 27, 33, 40 und 56 Tagen. Die männlichen Ratten aller Würfe wurden randomisiert und zu den oben angegebenen Tagen post partum untersucht.
- (2) Männliche Ratten mit einem Gewicht von 160 bis 180 g wurden täglich mit 1.0 mg/Tier Östradiolbenzoat (E₂) behandelt. Die Untersuchungen erfolgten nach der 2., 4., 6. und 7. Woche.
- (3) Männliche Ratten mit einem Gewicht von 160 bis 180 g erhielten täglich 10 mg/Tier Cyproteronacetat (CPA) und wurden nach der 2., 4., 6. und 7. Woche untersucht. Die hier angewandte Dosis (10 mg) führt zur Hemmung der Spermatogenese bei Ratten. (Schenck und Neumann 1976). Die Tötung erfolgte durch Dekapitation.

Die Substanzen Östradiolbenzoat und Cyproteronacetat wurden in einem Benzylbenzoat/Rizinusöl-Gemisch gelöst. Die Injektion erfolgte subkutan. Die Kontrolltiere wurden mit dem Lösungsmittel behandelt.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Gruppeneinteilung.

2.2 Untersuchung der FSH-Bindungskapazität im Hoden

Zur Anwendung kam die Methode von REICHERT und BHALLA (1974).

Tabelle 1

Gruppeneinteilung

Gruppe	Behandlung	Zahl der Tiere	Untersuchung
1 a b c d e f	- - - - - -	6 5 5 (2) (2) (5)	14. Lebenstag 20. " 27. " 33. " 40. " 56. "
2 a b c d	Östradiolbenzoat 1.0 mg/Tier/Tag subkutan	8 11 10 9	2. Behandlungswoche 4. " 6. " 7. "
3 a b c d	Cyproteronacetat 10.0 mg/Tier/Tag subkutan	11 10 10 11	2. Behandlungswoche 4. " 6. " 7. "
4 a b c d	Kontrolle (0,1 ml) Lösungsmittel /Tier/Tag	7 6 4 3	2. Behandlungswoche 4. " 6. " 7. "

2.3 Herstellung der Pufferlösungen und Gewinnung der Hoden-homogenate

2.3.1 Herstellung der Pufferlösungen

Es wurden Pufferlösungen hergestellt sowohl für

- 1) die radioimmunologische Hormonbestimmung (RIA)
als auch für
- 2) die Homogenisierung bzw. Inkubation von Hodengewebe.

PHOSPHATPUFFER:

0.5 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4): 69.0 g NaH_2PO_4 x H_2O werden in 500 ml Aqua bidest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

0.5 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4): 89.0 g Na_2HPO_4 x $2\text{H}_2\text{O}$ werden in 500 ml Aqua bidest. (40 bis 50°C) gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

0.5 M PHOSPHATPUFFERLÖSUNG:

Gleiche Teile 0.5 M NaH_2PO_4 und 0.5 M Na_2HPO_4 werden gemischt, auf pH 7.5 (mittels pH-Meter mit 1 NaOH) eingestellt, und als 1 ml Fraktionen bei -30°C aufbewahrt.

PBS - STAMMLÖSUNG (PHOSPHATGEPUFFERTE KOCHSALZLÖSUNG):

143.0 g NaCl werden in 500 ml Aqua bidest. gelöst, mit 1.75 g Merthiolat (Thimerosal), 120 ml 0.5 M NaH_2PO_4 und 240 ml 0.5 M Na_2HPO_4 versetzt und auf 1000 ml aufgefüllt.

0.01 PBS (pH 7.5):

57,2 ml der Stammlösung ad 1000 ml.

PBS - 1 % HSA (HUMAN SERUM ALBUMIN):

10.0 g getrocknetes HSA werden unter Rühren in 500 ml

0.01 M PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) gelöst, mit 10 ml einer 1 : 100 Merthiolate-Lösung versetzt und auf 1000 ml aufgefüllt.

0.05 M EDTA (ÄTHINYLEN DINITROLO TETRA ESSIGSÄURE):

18.6 g EDTA-Dinatrium werden in 800 ml 0.01 M PBS bei 40° C gelöst; 10 ml 1 : 100 Thimerosal in PBS werden hinzugefügt, auf pH 7.6 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt.

HOMOGENISATION- BZW. INKUBATIONSPUFFER:

Für die Homogenisation der Hoden bzw. Inkubation der Homogenate wird eine 0.01 M Phosphatpufferlösung benötigt.

0.01 M PHOSPHATPUFFERLÖSUNG:

57.2 ml PBS-Stammlösung werden auf ca. 800 ml aufgefüllt, hinzugefügt werden 5 mM $MgCl_2$ (1.0165 g), 0.1 M Saccharose (34.23 g) und 0.1 % kristallisiertes Eialbumin; es wird auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt.

Die obigen Puffersysteme wurden bei 2 bis 4° C aufbewahrt.

2.3.2 Gewinnung der Hodenhomogenate und der Blutseren

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch Dekapitation. Das Blut wurde von jedem Tier einzeln in Reagenzgläsern gesammelt und in einem Eisbad deponiert. Das Blut wurde zentrifugiert (ca. 10 Min. bei 1500 x g), und das Serum bei -30° C bis zum Zeitpunkt der Hormonbestimmung eingefroren.

Die Hoden wurden entnommen, gewogen und sofort in vorgekühlten Homogenisationspuffer überführt.

Von jeder Tierversuchsgruppe wurden 1 bis 2 Hodenpaare

für die histologische Untersuchung fixiert.

Die Aufarbeitung der Hoden wurde in einem Kühlraum bei 2 bis 4° C vorgenommen. Nach Freipräparation von der Tunica albuginea sowie von Blutgefäßen und Bindegewebe wurde das Hodengewebe (jeweils 1g/2 ml) zweimal in einer 0.01 M Phosphatpufferlösung pH 7.5 mit einem Handglas-homogenisator (Normalschliff-Gerätbau Wertheim) homogenisiert, durch 2 Gaseschichten filtriert und 10 min. bei 1500 x g in einer Kühlzentrifuge (Christ IV KS) zentrifugiert.

Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment so resuspendiert, daß die Konzentration 100 mg Homogenat pro 1 ml 0.01 M Phosphatpuffer entsprach.

2.4 Iodination von FSH

Erstmalig wurde die Möglichkeit einer radioaktiven Markierung von Proteohormonen durch die Chloramin-T-Methode von GREENWOOD, HUNTER und GLOVER (1963) beschrieben. Bei dieser Reaktionsfolge wird das Jodidnuklid ($^{125}\text{I}^-$) durch Chloramin T zu kationischem Jod ($^{125}\text{I}^+$) oxidiert, welches an den Tyrosylresten des zugegebenen Proteins H-Atome elektrophil substituiert. Nicht proteingebundenes $^{125}\text{I}^+$ wird anschließend mit Natriumdisulfit reduziert.

In dieser Arbeit gelangte eine Modifikation der Chloramin-T-Methode nach REICHERT und BHALLA (1974) zur Anwendung. (Siehe Tabelle 2.)

Es sei hier darauf hingewiesen, daß zur radioimmunologischen Hormonbestimmung auch radioaktiv markiertes Hormon (Tracer) benötigt wird. Daher müssen hier Besonderheiten hinsichtlich der spezifischen Aktivität des Tracers für jedes Untersuchungssystem (Rezeptorbestimmung und Radioimmunotest) berücksichtigt werden. Die für beide Systeme ermittelte spezifische Aktivität resultiert aus der Einbaurate des Radionuklids (Iod-125)

pro Molekül Proteinhormon und ist definiert als mCi/mg.

Anhand von Vorversuchen wurden die spezifischen Aktivitäten für beide Systeme optimiert. Die erforderliche Radioaktivität beträgt für die Rezeptorbestimmung 30 bis 80 mCi/mg Hormon und für den radioimmunologischen Test 100 bis 120 mCi/mg Hormon.

Die chemischen bzw. biologischen Eigenschaften des Hormons bei der Rezeptoruntersuchung und die immunologischen Eigenschaften des Hormons bei dem RIA sollten durch die radioaktive Markierung weitgehend unverändert bleiben.

DURCHFÜHRUNG DER IODINATION:

Als Proteohormone dienten Ratten-FSH (NIAMD-RAT-FSH-RP1) und Human-FSH (h-FSH-LER 1575 C-1) mit einer biologischen Aktivität von ca. 3000 IE/mg.

Es wurden nacheinander im geschlossenen Mikrolitersystem angesaugt: 1 mCi Natrium-Jodid-125 in 10 μ l 0.01 M NaOH; 50 μ l 0.5 M Phosphatpuffer pH 7.5; 5 μ g Rat-FSH (NIAMD-RAT-FSH-RP1 in 50 μ l); 20 μ l Chloramin-T-Lösung (2 mg/20 ml 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.5.

Nach ständigem Durchmischen wird die Reaktion nach 30 Sekunden mit 20 μ l Natriumdisulfitlösung (50 mg/20 ml 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.5) gestoppt. Die 80 μ l Reaktionsvolumen werden auf das Gelbett einer Sephadex G-100 Säule (19 cm Länge, 0.8 cm Durchmesser) überführt und mit 0.05 M Phosphatpuffer pH 7.5 eluiert.

500 μ l-Fractionen werden im gleichen Volumen einer 10%-igen HSA-PBS-Lösung gesammelt. Die radioaktive Messung der einzelnen Fractionen ergibt zwei Peaks, dabei entspricht der erste Peak dem ^{125}I -FSH und der zweite Peak dem freien Jodid.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität geschieht mittels Trichlor-Essigsäure (TCA) Präzipitation.

Nach abgeschlossener Markierung werden von den 80 μ l Reaktionsvolumen 10 μ l abgenommen und in 10 ml einer 0.01M

Tabelle 2

Jodinationsbedingungen von h-FSH nach REICHERT & BHALLA (1974)

Beschreibung	Veränderung		Anmerkung
	A	B	
1 μ M FSH	1.5×10^{-3}	1.5×10^{-3}	Molekulargewicht 33000
Verhältnis FSH : CAT	1 : 15	1 : 15	-
Temperatur	2 bis 4°C	2 bis 4°C	
Reaktionszeit	30 Sekunden	120 Sekunden	
Na ^{125}I (mCi)	1	2	Vor dem Zusatz von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$
Spezifische Aktivität ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	9.5 ± 2	35 ± 2	Mittelwert nach 3 Jodierungen
% spezifische Bindung	80	70	Bt-Bn/Bt x 100
% unspezifische Bindung	20	30	100 spezifische Bindungen
% biologische Aktivität nach der Jodination	100	46	
% am Rezeptor gebundenes ^{125}I -h-FSH unter Versuchsbedingungen	2 bis 4	2 bis 4	-

Die Methode "A" der Jodination nach Reichert et al. (1974) ist sowohl in Bezug auf die spezifische Aktivität des markierten h-FSH als auch der Quantität des am Rezeptor gebundenen Hormons (spezifische Bindung) am geeignetsten.

PBS-1 HSA überführt. 10 µl der Verdünnung werden in einem Inkubationsröhrchen vorgelegt und es wird die Impulsrate im Bohrloch ermittelt (Impulse/Min. gesamt). Nach totaler Präzipitation der Proteinmenge mit 1.5 ml einer 10 %igen TCA wird bei 2000 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Präzipitat wird 3 mal mit 0.05 M PBS gewaschen. Die im Präzipitat gemessene Impulsrate repräsentiert die Jodid-Einbaurrate im Protein.

B E R E C H N U N G :

Ermittlung der präzipitierbaren Proteinmenge:

$$\frac{5 \mu\text{g} \times 10^{-3}}{8} = 62.5 \times 10^{-8} \text{ mg} = 625 \text{ pg Protein}$$

Ermittlung des eingesetzten Nuclids (in mCi):

$$\frac{1 \text{ mCi} \times 10^{-3}}{8} = 12.5 \times 10^{-5} \text{ mCi} = 125 \text{ mCi}$$

Ermittlung des präzipitierten Tracer (mCi):

$$\text{Tracer (mCi)} = \frac{12.5 \times 10^{-5} (\text{mCi}) \times \text{cpm Präzipitat}}{\text{cpm gesamt}}$$

Bestimmung der spezifischen Aktivität (in mCi/mg):

Tracer (mCi)

präzipitierbare Proteinmenge (mg)

2.5 Bestimmung der ^{125}I -FSH-Bindungskapazität im Hoden

Im Abschnitt 2.3.2 und 2.4 ist bereits die Gewinnung des Untersuchungsmaterials (Hodenhomogenat) und des radioaktiv markierten Hormons behandelt worden.

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG:

Alle Puffer und Organpräparationen wurden bei 2 bis 4°C

aufbewahrt. Verwendet wurden Glaszentrifugenröhrchen 10 mm Länge und 7 mm Durchmesser. In jedes Röhrchen wurden 500 μ l der 0.01 M Phosphatpufferlösung pH 7.5 überführt. Hinzugefügt wurden 450 μ l (45 μ g) Hodenhomogenat und 50 μ l (5 μ g) 125 I-FSH. Die Röhrchen wurden dann mittels eines Vortex-Mixer (Cenco-Instrumenten MU-N-V) geschüttelt. Dieses 1 ml Reaktionsvolumen wurde im Wasserbad (Gerätebau B. Braun Melsungen AG) 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 1500 x g in einer Kühlzentrifuge (IV KS Krist) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das entstandene Pellet bei 1500 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes erfolgte die Bestimmung der Bindungskapazität in einem Autogammaspektrometer (Packard Teletype Driver Modell-49-26) ca. 1 Minute.

Bei jedem Versuch wurden 3 Aktivitätskontrollen, 3 mal Backgrounds und 3 bis 4 Meßwerte mitgeführt.

2.6 Berechnung der Meßeinheiten der Bindungskapazität

Die an dem Autogammaspektrometer nach 1 Minute abgelesene Messung ist als Impulsrate/Min. ausgedrückt. Hinsichtlich einer späteren Verwendung der Werte für einen Vergleich der Bindungskapazitäten in den verschiedenen Versuchsgruppen erscheint die Angabe der Bindung in Mol. FSH pro mg Homogenat bzw. pro 2 Hoden am geeignetsten.

Die Bindungskapazität wird dann (nach GOSPODOROWICZ 1973) in Mol. 125 I-FSH Bound/mg oder Tier ausgedrückt.

2.7 Bestimmung der spezifischen Bindungskapazität

Um zu zeigen, daß die Rezeptorbindung von FSH spezifisch ist, werden verschiedene Konzentrationen von nativem FSH dem 125 J-FSH-Rezeptor-Komplex hinzugefügt. Das Ausmaß der Konkurrenz von FSH zu 125 I-FSH in Bezug auf die Re-

zeptorbindung ist ein Parameter für die Affinität (und damit Spezifität) des Hormons zum Rezeptor.

In Abbildung 3 wird die Verdrängung des radioaktiv markierten FSH vom Rezeptor durch Zugabe verschiedener Konzentrationen von nativem FSH dargestellt.

2.8 Radioimmunologische Bestimmung der Serumblutspiegel von FSH, LH und Testosteron

2.8.1 Prinzip des Radioimmunoassays

Beim Radioimmunotest sind zum Nachweis eines Hormons spezifische Antikörper gegen das betreffende Hormon (Antigen) notwendig. Antikörper und Hormon (= Antigen) bilden einen Antikörper-Hormon-Komplex. Das Prinzip des Testes basiert auf einer Konkurrenzreaktion von radioaktiv-markiertem und nicht-markiertem (zu messenden) Hormon um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen am Antikörper. In Abbildung 4 ist das Testmodell schematisch dargestellt.

Geht man davon aus, daß ein Antikörper (AK) 100 Bindungsstellen aufweist, dann ist er in der Lage, 100 Moleküle des zu messenden Hormons bzw. des radioaktiv-markierten, zugesetzten Hormons zu binden (s. Abbildung). Läßt man jedoch den Antikörper mit radioaktiv unmarkiertem Hormon reagieren - wie es in der Abbildung dargestellt ist - dann stehen nicht mehr genügend Bindungsstellen zur Verfügung. In diesem konkreten Beispiel stehen 100 Bindungsstellen des Antikörpers 200 Moleküle an Hormon gegenüber. Da der Antikörper gleiche Affinität zu dem markierten und nicht-markierten (zu messenden Hormon) hat, werden nur jeweils 50 Moleküle gebunden und je 50 Moleküle des radioaktiv zugesetzten sowie des zu messenden Hormons werden nicht gebunden und bleiben frei. Je größer die zugegebene Menge des unmarkierten Antigens (des zu messenden Hormons) ist, desto weniger radioaktive Moleküle

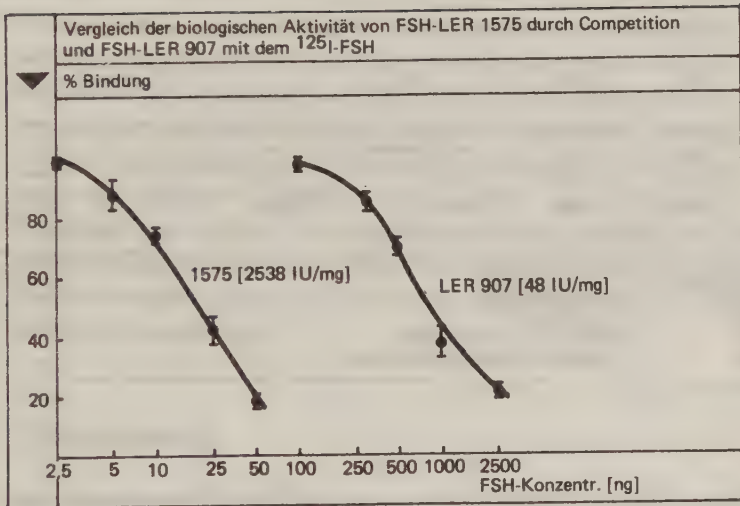


Abb. 3 Vergleich der biologischen Aktivität von FSH-LER 1575 durch Competition und FSH-LER 907 mit dem ^{125}I -FSH

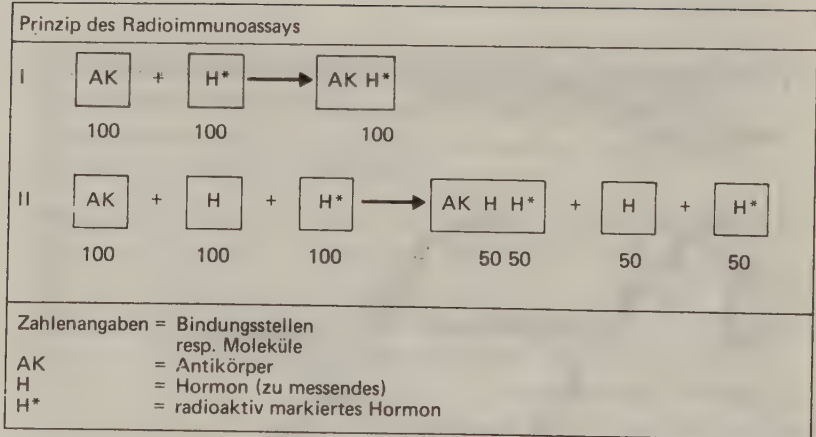


Abb. 4 Prinzip des Radioimmunoassays

können an den Antikörper gebunden werden und umso höher wird der freie Anteil des Antigens sein. Durch Parallelansätze mit definierten Mengen eines Antigens (Hormons) ist es möglich, Eichkurven zu erstellen (s. Abbildung 5,6,7). Der Hormongehalt einer zu messenden Probe kann dann unter Zuhilfenahme der Eich- bzw. Standardkurve abgelesen werden.

Dieses Prinzip gilt sowohl für die Proteohormone (FSH und LH) als auch für das Steroidhormon (Testosteron). Methodische Unterschiede bestehen im wesentlichen in der Trennung des freien vom antikörper-gebundenen Hormons. Die für die beiden Proteohormone angewandte "Double Antibody Method" (PARLOW et al. 1970) ermöglicht die Trennung des Tracer vom Antigen-Antikörper-Komplex durch Präzipitation. Bei dem Steroidhormon Testosteron wird diese Trennung nach der Charcoal-Dextran-Methode (HASAN 1974) durchgeführt.

2.8.2 FSH-Bestimmung

Zur Durchführung dieser Bestimmung müssen einige Grundvoraussetzungen erfüllt sein:

- 1) Das FSH muß in hochgereinigter Form (NIAMD-RAT-FSH-I-³) zur radioaktiven Markierung mit ¹²⁵I verfügbar sein. (100 µg NIAMD-RAT-FSH-I-³ wurden in PBS gelöst und in Fraktionen à 1 µg/10 µl bei -20° C aufbewahrt.)
- 2) Ein gegen Ratten-FSH gerichtetes spezifisches Antiserum, das mit dem Hormon eine reversible Bindung eingeht, muß vorliegen. Den Antikörper gewinnt man durch Immunisierung von Kaninchen mit hochgereinigtem FSH. Das Antiserum liegt in 0.05 M EDTA-PBS verdünnt à 100 µl Fraktionen vor und wird bei -20° C aufbewahrt.
- 3) Zum Erstellen der Standardbindungskurve wurde das NIAMD-RAT-FSH-Referenz-Präparat Nr. 1 eingesetzt.

2.8.3 Durchführung des FSH - RIA

- 1) 10 x 75 mm Teströhrchen werden im Eisbad deponiert.
- 2) Der im Kühlschrank langsam aufgetaute Standard NIAMD RP-1* (1000 ng/100 µl) wird so in 1 % HSA-PBS** verdünnt, daß sich der Standardkurvenbereich von 250 pg bis 50 ng/400 µl erstreckt.
- 3) 100 µl bzw. 200 µl der zu untersuchenden Seren werden pipettiert. Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, sollte das Serum kurz vor der Untersuchung nur einmal im Kühlschrank langsam aufgetaut werden. Während des Pipettierens die Seren im Eisbad deponieren.
- 4) Mit 1 % HSA-PBS auf 400 µl total bringen.
- 5) 200 µl des NIAMD-Anti-Rat-FSH-S-1*** 1:5.0 x 10³ pipettieren.
- 6) Das jodierte Ratten-FSH (J¹²⁵ NIAMD-Rat-FSH-J-1)**** pipettieren. Der Tracer sollte so eingestellt sein, daß ca. 2 x 10⁴ cpm in 100 µl 1 % HSA-PBS enthalten sind.
- 7) Gut mischen.
- 8) Drei bis 5 Tage bei 4° C inkubieren.
- 9) Mit 100 µl Anti-Kaninchen-Gammaglobulin***** versetzen.
- 10) Gut mischen.
- 11) Für 12 bis 14 Stunden im Kühlschrank inkubieren.
- 12) Für 30 Minuten bei ca. 2000 x g zentrifugieren.

* NIAMD = vom National Institute for Arthritis
**** an Metabolic Diseases

** HSA-PBS = Human Serum Albumin - Phosphate
Buffer Saline

***** Anti-Rabbit Precipitating Serum Donkey for RIA
(von der Firma WELLCOME)

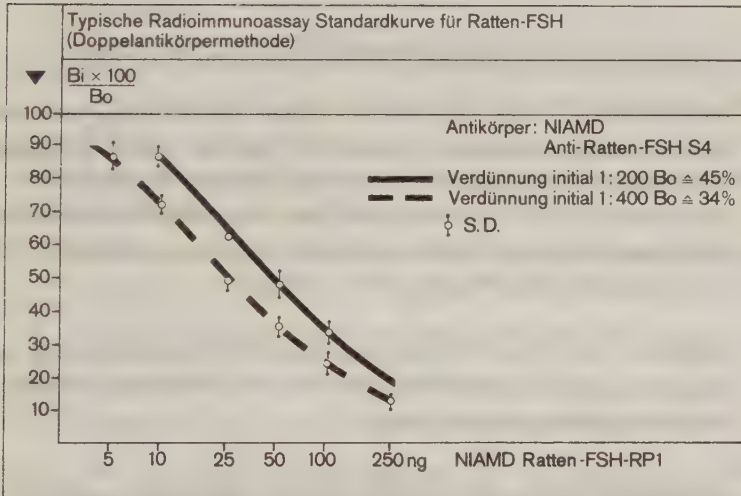


Abb. 5 Typische Radioimmunoassay Standardkurve
für Ratten-FSH (Doppelantikörpermethode)

- 13) Den Überstand in ein Becherglas dekantieren.
- 14) Die Röhrchen zum Auslaufen senkrecht auf Fließpapier stellen.
- 15) Die Impulse des Präzipitats messen und in Relation zum Reference Präparat (NIAMD-Rat-FSH-RP-1) setzen.
- 16) Das Ergebnis wird als ng NIAMD-Rat-FSH-RP-1 pro ml Serum angegeben.

2.8.4 Durchführung des Radioimmunotests für Testosteron

ANTIKÖRPER: Als Antikörper wurde anti-Testosteron-3-hydroxy-carboxy-methyl-oxim-BSA (Bovine Serum Albumin) in einer Verdünnung 1: 3500 eingesetzt. Nennenswerte Kreuzimmunitäten bestehen zu den Steroiden 5 α -Androstan-17 β -hydroxy-3-on (30 %), Androst-5-en-3,3,17 β -diol (14%) und 5 α -Androstan-3 β ,17 β -diol (18 %).

TRACER: (1,2,6,7-³H)-Testosteron (³H-Testosteron) mit einer spezifischen Aktivität von 94 Ci/m mol. (Firma AMERSHAM BUCHLER TRK 402).

STANDARDKURVE: Die Standardkurve wurde mit chromatographisch gereinigtem Testosteron angesetzt.

PUFFERSYSTEME: a) 10 m Molarer Phosphatpuffer + 0.1 % Gelatine pH 7.6, b) 10 m Molarer Phosphatpuffer + 0.5 % Gelatine pH 7.6.

TRENNUNG VON GEBUNDENEM UND FREIEN HORMON: Die Trennung der am Antikörper gebundenen ³H-Testosteron vom freien ³H-Testosteron erfolgte mit einer Charcoal-Dextran-Suspension (CDS), (400 mg Dextran 110 + 2.5 g Aktivkohle ad 1 L Puffer A).

Nach Pelletierung der Aktivkohle durch Zentrifugieren (1500 x g) befindet sich der absorbierte, nicht am Antikörper gebundene Anteil des Tracer, im Sediment. Der Über-

stand, der die am Antikörper gebundenen Tracerliganden enthält, wurde dekantiert, mit Scintillatorcocktail (10 ml Instagel) emulgiert und die Radioaktivität als Zerfälle pro Minute im Scintillationsspektrophotometer (Fa. PACKARD Mod. 544) gemessen.

DURCHFÜHRUNG:

1. 200 μ l Serum bzw. Standardtestosteron (Bereich 7.8 pg bis 1 ng) mit 4 ml frisch destilliertem Äther extrahieren.
- 2) Trennen der Ätherphase vom wässrigen Anteil durch Zentrifugieren (1500 x g).
- 3) Einfrieren der wässrigen Schicht im Methanol-Trockeneisbad.
- 4) Dekantieren der testosteron-haltigen Ätherphase.
- 5) Evaporieren des Lösungsmittels.
- 6) Aufnehmen des Rückstandes in 200 μ l Puffer A.
- 7) 100 μ l Antikörperverdünnung (in Puffer A) pipettieren und
- 8) mit 100 μ l tritiiertem Testosteron durchmischen. Der Tracer sollte so eingestellt sein, daß 10^4 DPM in 100 μ l Lösung (Puffer A) enthalten sind.
- 9) Für 16 Stunden bei 4° C inkubieren und
- 10) die Proben ins Eisbad transferrieren.
- 11) 100 μ l Puffer B pipettieren.
- 12) Ansatz mit 1 ml CDS gut durchmischen und sofort zentrifugieren (1500 x g).
- 13) Dekantieren, Messen der Impulsrate und prozentualen Tracer uptake kalkulieren.

BESTIMMUNG DER HORMONKONZENTRATION: Die Bestimmung der

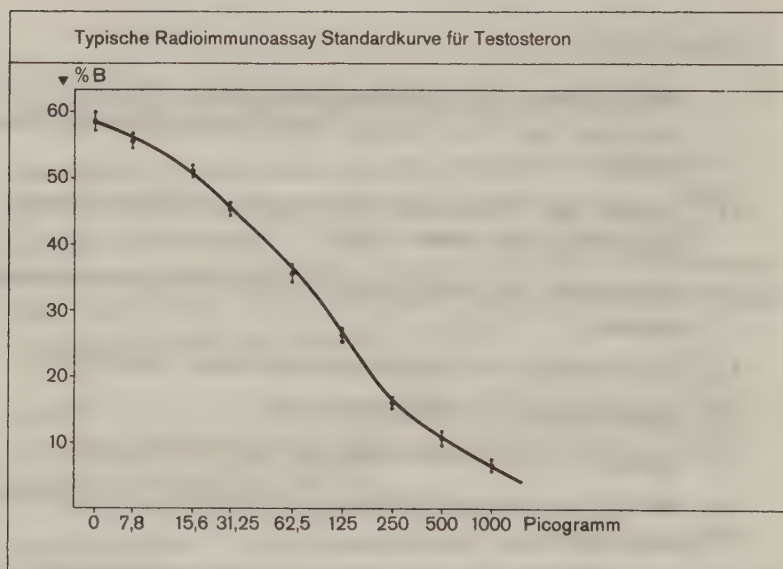


Abb 6 Typische Radioimmunoassay Standardkurve für Testosteron

unbekannten Serumtestosteronkonzentration erfolgte aus der zu jedem Ansatz mitlaufenden Standardkurve. Diese ergibt sich aus der für einen bestimmten Bereich gültigen proportionalen Abnahme der Impulsrate mit steigender Testosteronkonzentration. Der typische Verlauf einer solchen Standardkurve wird in Abbildung 6 demonstriert.

LH - Bestimmung

Die LH - Bestimmung braucht nicht näher erläutert zu werden, weil die Methodik mit der für die FSH - Bestimmung fast identisch ist.

Durch eine Standardkurve (s. Abbildung 7) kann die LH-Konzentration in den verschiedenen Serumproben ermittelt werden.

2.9 Hodenhistologie

Jeweils 2 Versuchstiere jeder Versuchsgruppe wurden zur histologischen Untersuchung herangezogen.

2.9.1 TECHNIK DER HODENHISTOLOGIE: Die Organe wurden 24 Stunden in einem Susa-Gemisch fixiert und dann erfolgte die Herstellung von Paraffinschnitten von ca. 5 μ Dicke. Das Paraffin wurde in Xylol mit absteigender Alkoholreihe und Hg-Niederschläge in Jod/Natriumthiosulfatlösung entfernt. Dann wurden die Schnitte ca. 5 Minuten in eine Perjodat-Säurelösung gestellt und anschließend mit 70 %igem Alkohol gespült. Zum restlosen Entfernen von Perjodat und Jodat wurden sie 5 Minuten in eine reduzierende Spülflüssigkeit gestellt und anschließend mit 70 %igem Alkohol gespült. Nach Einwirkung von Schiff'sche Reagenz (15 bis 45 Minuten) und 3-maligem Spülen mit SO₂-Wasser wurden sie abschließend 15 Minuten unter fließendes Wasser gestellt.

Es folgten eine Hämatoxylinfärbung (10 Sekunden) und eine Aqua dest.-Spülung. Schließlich wurden die Präparate

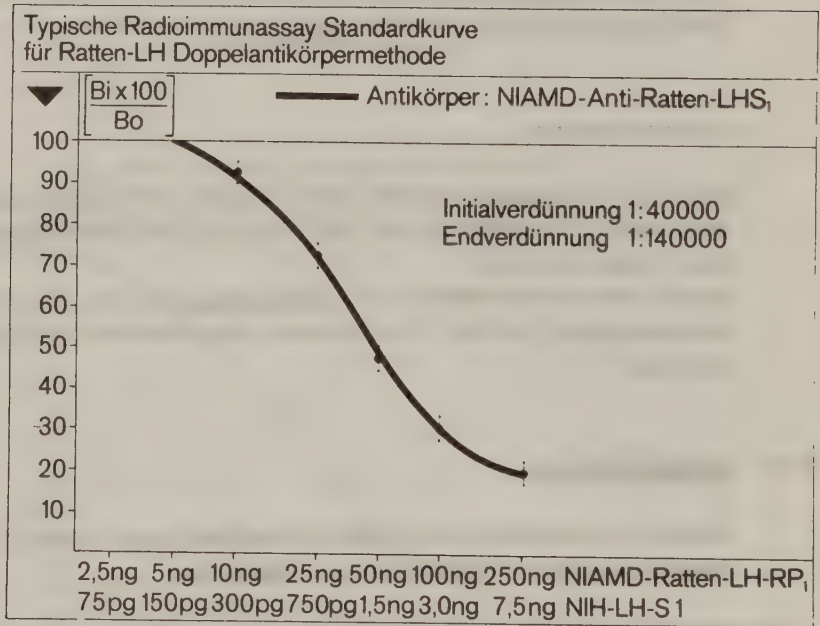


Abb. 7 Typische Standardkurve für LH

5 Sekunden in 0.002 %igem Lichtgrün eingebracht, wieder mit Aqua dest. gespült und nach Entwässerung (aufsteigende Alkoholreihe) mit Eukitt eingedeckt.

2.9.2 Histomorphometrische Untersuchungen am Hoden

ERMITTLUNG DER DURCHMESSER DER TUBULI SEMINIFERI:

Die Durchmesser der Tubuli seminiferi lassen gewisse Rückschlüsse auf die generative Hodenfunktion zu und sollten die qualitativ histologischen Untersuchungen ergänzen.

METHODIK DER DURCHMESSER-MESSUNG:

Die Durchmesser der Tubuli seminiferi wurden in den histologischen Präparaten mittels eines Lichtmikrometers (BANART REICHERT) gemessen. In jedem histologischen Präparat wurden mindestens 50 Tubuli gemessen. Aus diesen 50 Messungen wurde ein Mittelwert erstellt. Das Produkt zwischen diesem Mittelwert und dem Vergrößerungsfaktor 75 gibt den Durchmesser der Tubuli seminiferi in μ an.

2.10 Statistische Bearbeitung

Für jede Versuchsgruppe wurde die Standardabweichung des Mittelwertes errechnet. In den Tabellen 3, 4, 6, 8 und 15 sind die Werte aufgeführt.

Die Signifikanzüberprüfung erfolgte mit Hilfe des U-Tests. Die gefundenen Werte werden im Anschluß an die jeweiligen Tabellen bzw. Abbildungen aufgeführt.

Alle Berechnungen wurden im Rechenzentrum der SCHERING AG durchgeführt.

III.

ER G E B N I S S E

3.1 FSH-Bindungskapazität und Morphologie von Rattenhoden sowie Hormonprofile in Abhängigkeit vom Reifezustand (Lebensalter) der Tiere

3.1.1 Lebensalter und FSH-Bindungskapazität

Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Untersucht wurde die FSH-Bindungskapazität in Hodenhomogenaten von 14, 20, 27, 33, 40 und 56 Tage alten Ratten. Die gefundenen FSH-Bindungskapazitäten wurden auf die absoluten Hodengewichte bezogen.

Wie Abbildung 8 zeigt, nimmt die FSH-Bindungskapazität mit zunehmendem Lebensalter sukzessiv zu.

Dies korreliert sehr gut mit den histologischen Befunden, denn bei 33 Tage alten Tieren läuft die Reifeteilung bereits ab, und bei 56 Tage alten Tieren ist die Phase der Pubertät beendet.

Zwischen den FSH-Bindungskapazitäten 56 Tage alter Tiere und denen normaler erwachsener Kontrollen bestehen keine signifikanten Unterschiede.

3.1.2 Hodenmorphologie

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den Abbildungen 9 bis 14 näher veranschaulicht. Das Hodenbild 14 Tage alter Tiere entspricht noch weitgehend dem des foetalen Hodens. Die Tubuli sind klein und enthalten neben Sertolizellen und Spermatogonien nur frühe Spermatozytenformen, wie präleptotene und leptotene Spermatozyten. Die erste Zwischenzellgeneration, die normalerweise gegen Ende der foetalen Entwicklung und in den

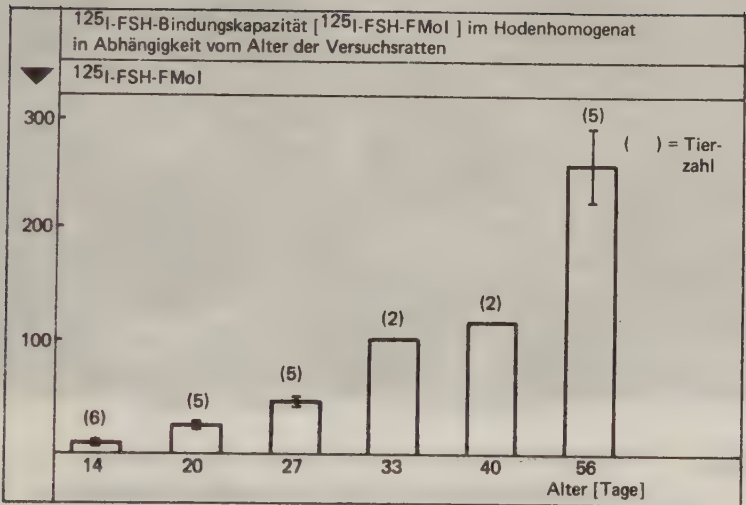


Abb. 8 ¹²⁵I-FSH-Bindungskapazität im Hoden-
homogenat in Abhängigkeit vom Alter der
Versuchstiere

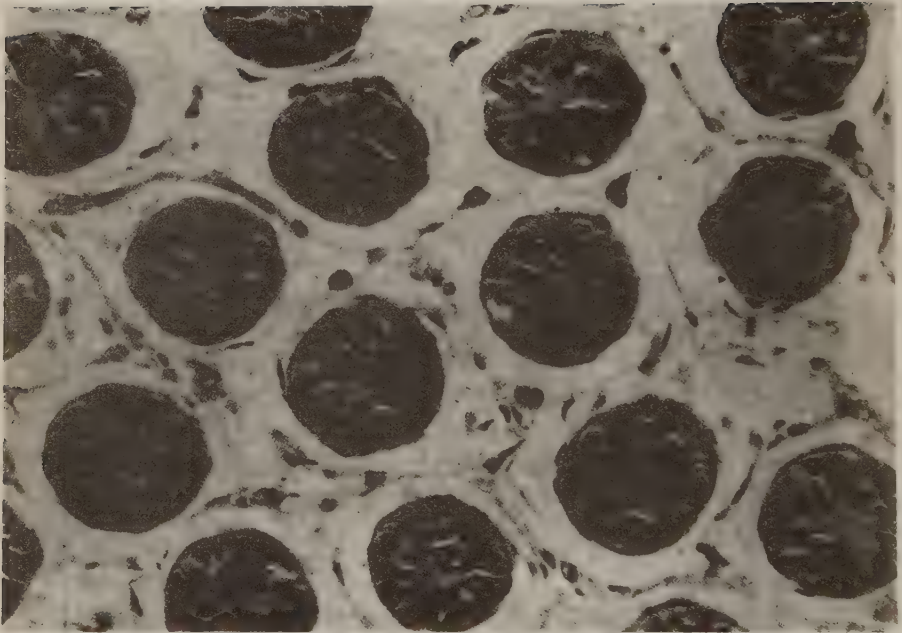


Abb. 9 Hodenentwicklung von 14 Tage alten Ratten.
Das Bild entspricht noch weitgehend dem foetalen Hoden. Neben Sertolizellen und Spermatogonien erkennt man nur ganz frühe Spermatocytenformen (präleptotene und leptotene Spermatocyten). Die erste Zwischenzellgeneration, die gegen Ende der Schwangerschaft und in den ersten Lebenstagen in Erscheinung tritt, ist verschwunden.

Vergrößerung: 400 x
Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

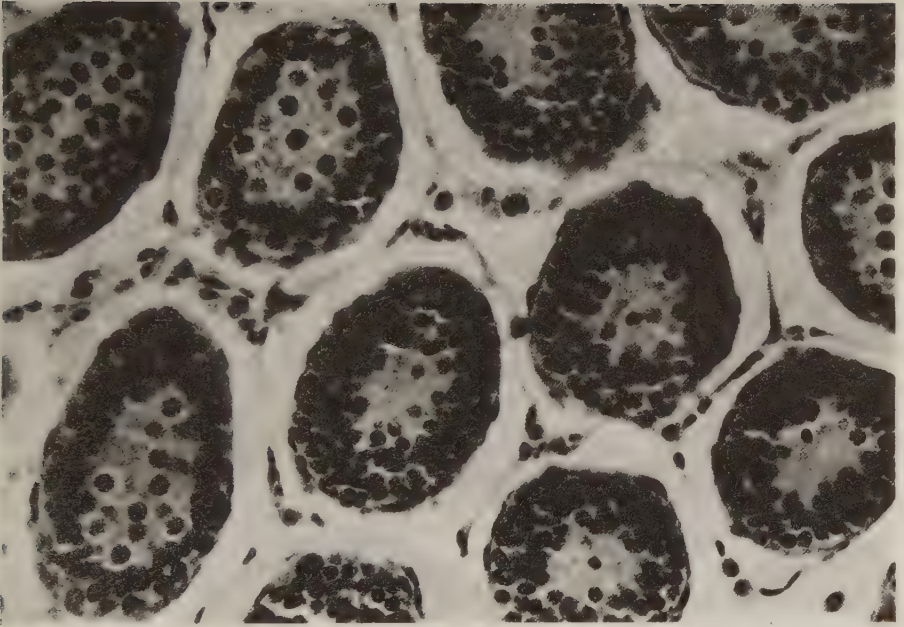


Abb. 10 Hodenentwicklung von 20 Tage alten Ratten. Deutlich erkennbar ist die Vergrößerung der Tubuli sowie die Aktivierung der Spermatogenese. Es treten schon pachytene Spermatocyten auf; die Reifeteilung läuft aber noch nicht ab. Die Leydig'schen Zwischenzellen treten nach wie vor kaum in Erscheinung.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

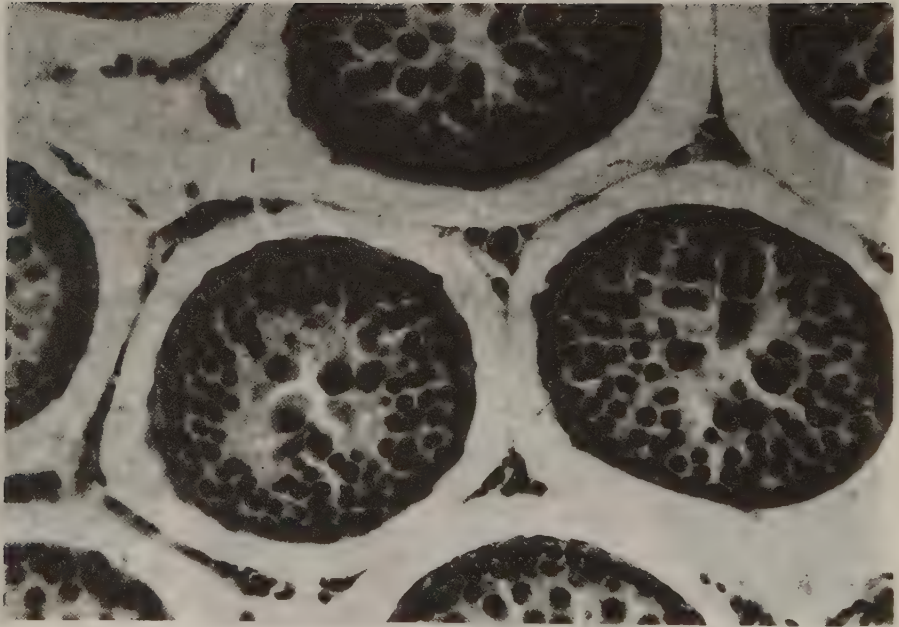


Abb. 11 Hodenentwicklung von 27 Tage alten Ratten. Das Bild unterscheidet sich kaum von dem 20 Tage alter Tiere. Allerdings hat die Tubulusgröße zugenommen. Die Zwischenzellen erscheinen immer noch wenig aktiv. Reifeteilungen finden noch nicht statt.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

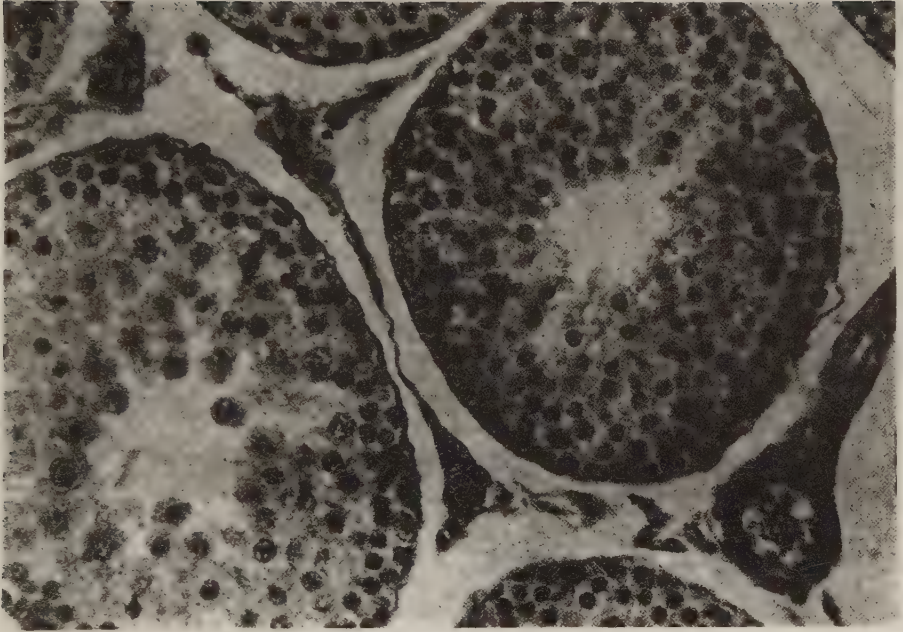


Abb. 12 Hodenentwicklung von 33 Tage alten Ratten. Die Tubulusgröße hat sprunghaft zugenommen. Man sieht zahlreiche Mitosen und frühe Spermatidenformen, d.h. Reifeteilungen laufen ab und damit setzt der Prozess der Spermiogenese ein. Gegenüber dem 27 Tage alten Tieren fällt auch die deutliche Aktivierung der Leydig'schen Zwischenzellen auf.

Vergrößerung: 400 x
Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

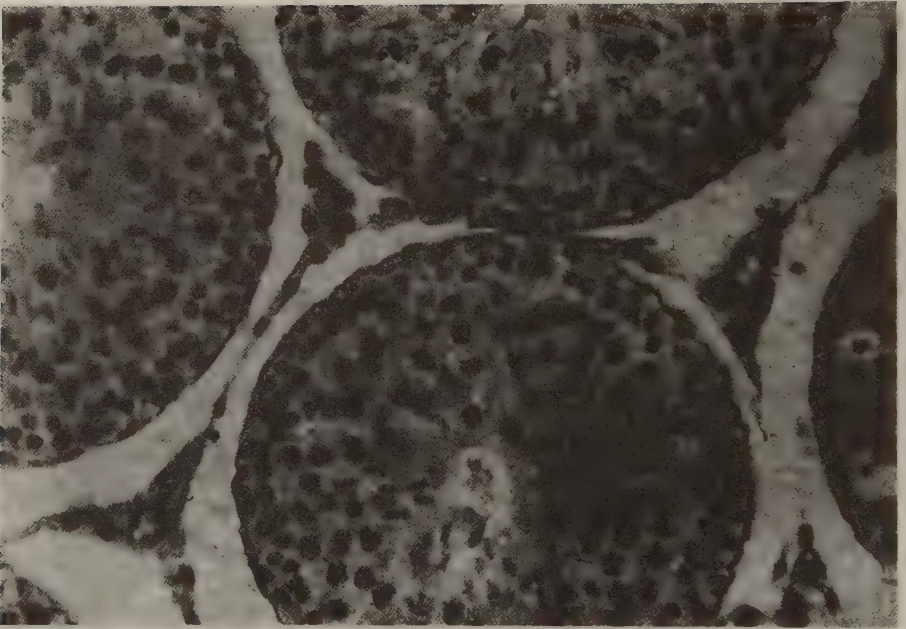


Abb. 13 Hodenentwicklung von 40 Tage alten Ratten.
Das Hodenbild entspricht im großen und ganzen
dem 33 Tage alter Tiere. Die Spermiogenese
ist weiter fortgeschritten. Man erkennt die
ersten Spermatozoen.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

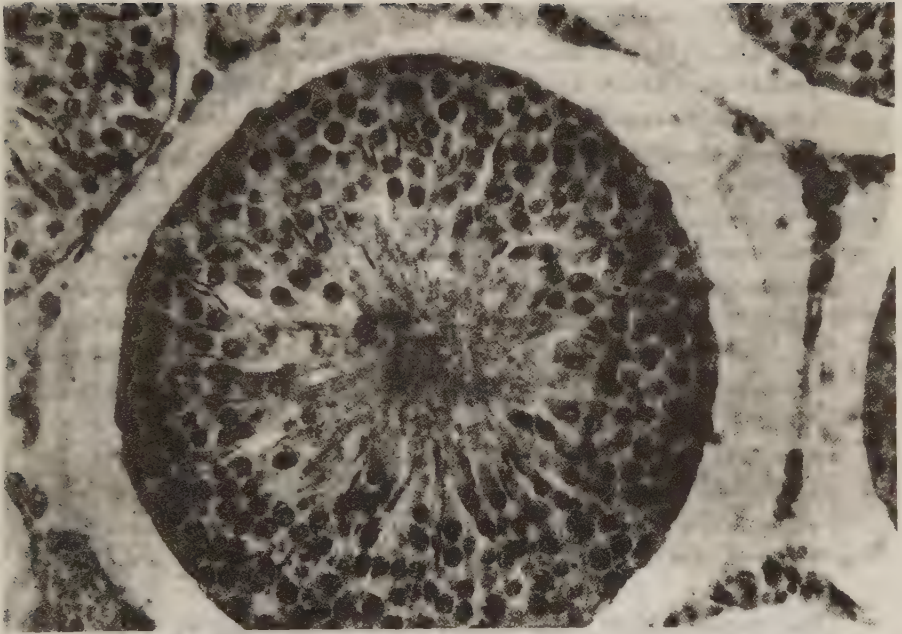


Abb. 14 Hodenentwicklung von 56 Tage alten Ratten.
Die Tubulusgröße hat weiter zugenommen und
entspricht etwa der erwachsener Ratten.
Man erkennt voll ausgereifte Spermatozoen.
56 Tage alte Ratten haben die Pubertät be-
reits hinter sich und sind fertil.

Vergrößerung: 400 x
Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

ersten Lebenstagen zu beobachten ist, hat sich zurückgebildet. Zwanzig Tage alte Tiere zeigen - gegenüber den 14 Tage alten Ratten - bereits ein deutliches Tubuluswachstum. Es ist deutlich erkennbar, daß die Spermatogenese einsetzt. Alle Stadien der Spermatocyten, bis hin zu den pachytenen Spermatocyten sind vorhanden. Die Reifeteilung läuft jedoch noch nicht ab, und die Zwischenzellen treten nach wie vor nicht in Erscheinung. Bei den 27 Tage alten Tieren bietet sich ein ganz ähnliches Bild. Das Tubuluswachstum ist jedoch weiter vorangeschritten. Reifeteilungen laufen noch immer nicht ab. Die Reifeteilung setzt erst zwischen dem 27. und 33. Lebenstag ein, wie Abbildung 12 zeigt. Es finden sich nämlich bei 33 Tage alten Tieren bereits zahlreiche Spermatiden - ein Hinweis auf die abgelaufene Reifeteilung. Auch werden zahlreiche Mitosen erkennbar. Die Zwischenzellen sind gut entwickelt und entsprechen in ihrer Form, Größe und Zahl etwa denen normaler, erwachsener Tiere.

Das Hodenbild 40 Tage alter Tiere (Abbildung 13) ist ganz ähnlich. Die Spermiogenese ist jedoch weiter vorangeschritten, und man erkennt bereits die ersten Spermatozoen. Bei 56 Tage alten Ratten ist die Pubertät abgeschlossen. Es finden sich alle Stadien der Spermatogenese und Spermiogenese. Das Hodenbild entspricht dem normaler, erwachsener männlicher Kontrolltiere.

3.1.3 Hodenmorphometrie (Durchmesser der Tubuli seminiferi)

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Tabelle 3 und in Abbildung 15 wiedergegeben. Vergleicht man die Durchmesser der Tubuli seminiferi 14 Tage alter und 56 Tage alter Ratten, dann erkennt man eine beinahe lineare Zunahme der Durchmesser. Ein gewisser Sprung liegt vor zwischen 27 und 33 Tage alten Tieren und 40 und 56 Tage alten Ratten.

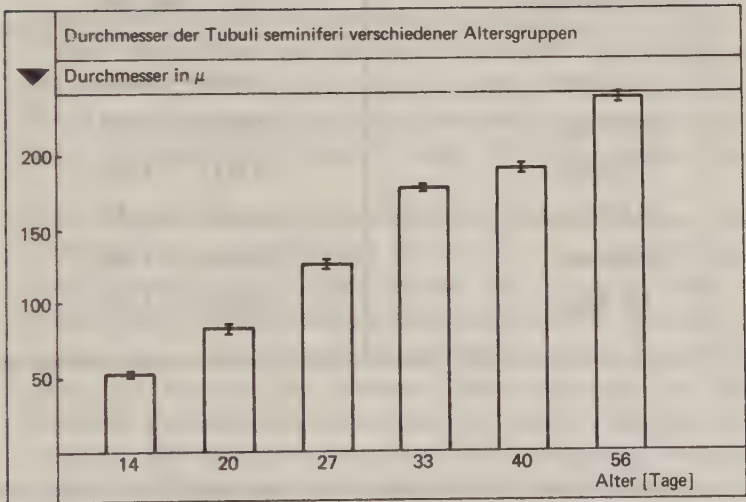


Abb. 15 Durchmesser der Tubuli seminiferi
verschiedener Altersgruppen

Tab. 3

Mittelwerte der Durchmesser der Tubuli seminiferi verschiedener Altersgruppen

Altersgruppe	X + SEM (μ)
14 Tage	52.12 $\pm$ 0.37
20 Tage	80.00 $\pm$ 0.60
27 Tage	123.14 $\pm$ 1.08
33 Tage	171.48 $\pm$ 1.17
40 Tage	186.54 $\pm$ 1.30
56 Tage	234.64 $\pm$ 1.35

Parallel zur Entwicklung der Leydigzellen wurde eine fortschreitende Vergrößerung der Durchmesser der Tubuli seminiferi festgestellt. Diese Zunahme reicht von ca. 52 μ bei 14 Tage alten juvenilen Ratten bis etwa 234 μ bei 56 Tage alten adulten Ratten.

Zwischen dem 27. und 33. Tag setzt die Reifeteilung ein.
Zwischen dem 40. und 56. Tag wird die Pubertät abgeschlossen.

3.1.4 Hormonprofile (Serumkonzentrationen von FSH, LH und Testosteron in den verschiedenen Reifestadien (Altersgruppen))

Die FSH-Serumkonzentrationen steigen vom 14. bis zum 56. Lebensstag bei Ratten kontinuierlich an, wobei aber die Werte von 14 Tage alten Tieren bereits verhältnismäßig hoch sind. Bei 20 Tage alten Tieren läuft die Spermatogenese auch schon bis zur Reifeteilung ab (vergl. dazu Tabell 4):, wahrscheinlich spielt dabei FSH auch schon eine Rolle.

Die LH- und Testosteronkonzentrationen im Serum steigen deutlich mit zunehmenden Alter an - verglichen mit den Werten 27 Tage alter Ratten. Mit diesem Befund korreliert gut die Entwicklung der Leydigzellen (vergl. dazu Tabelle 4). Bei 33 Tage alten Tieren läuft auch bereits die Reifeteilung ab, offenbar zurückzuführen auf das nunmehr in genügenden Mengen zur Verfügung stehende Testosteron. Die höchsten LH und FSH-Werte liegen am 40. Lebensstag vor. Dieses Entwicklungsstadium entspricht bereits der peripuberalen Zeit, wo höhere LH- und FSH-Serumkonzentrationen vorliegen als bei erwachsenen Tieren (DÖHLER & WUTTK 1974). Die Konzentration von Testosteron im Serum nimmt mit zunehmendem Alter der Tiere bis hin zur Geschlechtsreife (56 Tage) zu.

3.2 FSH-Bindungskapazität und Morphologie von Rattenhoden sowie Hormonprofile nach Behandlung mit Östradiolbenzoat

3.2.1 FSH-Bindungskapazität

Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 wiedergegeben. Bereits nach 2- bis 4-wöchiger Behandlung mit Östradiol-

Tab. 4

Konzentration von FSH, LH und Testosteron
in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Ratten

Alters- gruppe	Tier- zahl	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)	Testosteron (ng/ml)
14 Tage	4	272 ± 16	28 ± 3	0.695 ± 0.2
20 Tage	3	285 ± 21	40 ± 7	1.015 ± 0.4
27 Tage	4	293 ± 13	32 ± 5	1.055 ± 0.2
33 Tage	5	298 ± 11	65 ± 9	1.230 ± 0.3
40 Tage	5	475 ± 32	85 ± 15	1.330 ± 0.3
56 Tage	4	313 ± 23	34 ± 6	1.850 ± 0.5

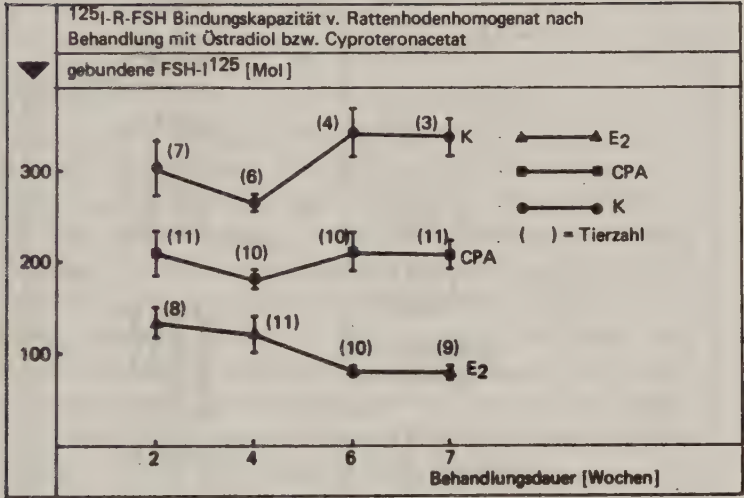


Abb. 16 ^{125}I -R-FSH-Bindungskapazität von Rattenhodenhomogenaten nach Behandlung mit Östradiolbenzoat bzw. Cyproteronacetat

Tab. 5 ERGEBNISSE DER U - TESTE FÜR DIE FSH - BINDUNGSKAPAZITÄT

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4 c	3.0	-	5	-	2	1	1	1	1	1	1	1
4 d	0.0	0.0	1	10	1	1	1	1	1	2	1	1
4 b	3.0	4.0	11.0	-	1	1	-	1	1	-	1	5
4 a	0.0	0.0	2.0	0.0	1	1	5	1	1	5	1	1
2 a	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	1	2	-	1	5	-	1
2 d	0.0	0.0	0.0	0.0	14.0	0.0	1	1	-	1	1	1
3 c	0.0	0.0	20.0	0.0	13.0	0.0	30.0	-	1	-	2	-
3 b	0.0	0.0	4.0	0.0	21.0	1.0	0.0	0.0	1	10	5	10
2 c	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	39.0	0.0	0.0	1.0	1	10	1
3 a	0.0	3.0	22.0	13.0	18.0	2.5	52.0	31.0	31.0	21.0	1	-
2 b	0.0	0.0	5.0	3.0	31.0	36.0	19.0	24.0	0.0	20.0	1	-
3 d	0.0	0.0	13.0	8.0	11.0	0.0	52.0	28.0	0.0	55.0	20.0	1

oben rechts: Testwahrscheinlichkeiten P

unten links: Empirische U-Werte

Gruppe 4c = Kontr. 6 Wochen, Gruppe 2a = E₂ 2 Wochen, Gruppe 2c = E₂ 6 Wochen,
 Gruppe 4d = Kontr. 7 Wochen, Gruppe 2d = E₂ 7 Wochen, Gruppe 3a = CFA 2 Wochen,
 Gruppe 4b = Kontr. 4 Wochen, Gruppe 3c = CFA 6 Wochen, Gruppe 2b = E₂ 4 Wochen,
 Gruppe 4a = Kontr. 2 Wochen, Gruppe 3b = CPA 4 Wochen, Gruppe 3d = CFA 7 Wochen

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
 10 = Signifikanz auf dem 10 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
 5 = Signifikanz auf dem 5 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
 2 = Signifikanz auf dem 2 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
 1 = Signifikanz auf dem 1 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
 * = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 %-Niveau zu klein

benzoat nimmt die FSH-Bindungskapazität im Hoden um 57 %, nach 6- bis 7-wöchiger Behandlung sogar um 70 % ab. Die Abnahme der FSH-Bindungskapazität unter Östradiolbenzoat ist gut korreliert mit dem Hodengewichtsverlust, wie Abbildung 16 zeigt.

3.2.2 Hodenmorphologie

Bereits nach 14-tägiger Behandlung unter Östradiolbenzoat wird die Atrophie der Hodentubuli deutlich, vor allem erkennbar an den gewellten Tubuluswandungen. Reife Spermatozoen können kaum mehr beobachtet werden. Die Lumina der Tubuli seminiferi sind angefüllt mit einer amorphen Masse, wahrscheinlich Reste degenerativ zugrunde gegangener Zellen des Keimepithels. Auch die Leydig'schen Zwischenzellen sind atrophisch (Abbildung 18). Nach 4-wöchiger Behandlung ist die Atrophie der Tubuli seminiferi nahezu maximal. Das Bild entspricht etwa dem einer Hypophysektomie. Auffällig ist eine Depopulation des Keimepithels und das Ausbleiben der Reifeteilung. In den Lumina der Hodentubuli sieht man neben amorphen Massen mehr- und vielkernige Riesenzellen. Das Auftreten von Riesenzellen ist ein allgemeines Phänomen beim Ablauf degenerativer Veränderungen im Keimepithel (s. dazu auch Diskussion).

Das Zwischenzellgewebe ist vollkommen atrophisch. Die Zwischenzellen ähneln Fibroblasten. Nach 7-wöchiger Behandlung (Abbildung 20) bietet sich das gleiche Bild.

3.2.3 Histomorphometrie (Durchmesser der Tubuli seminiferi)

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 6 und Abbildung 21 dargestellt. Bereits nach 14-tägiger Behandlung mit Östradiolbenzoat sind die Durchmesser der Hodentubuli stark reduziert.

Nach 6-wöchiger Behandlung wird bereits ein Tiefstwert



Abb. 17 Unbehandelte Kontrolle (Ratten)
 Normale Spermatogenese, Spermiogenese
 sowie Leydigzell-funktion.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS-Haematoxylin-Lichtgrün

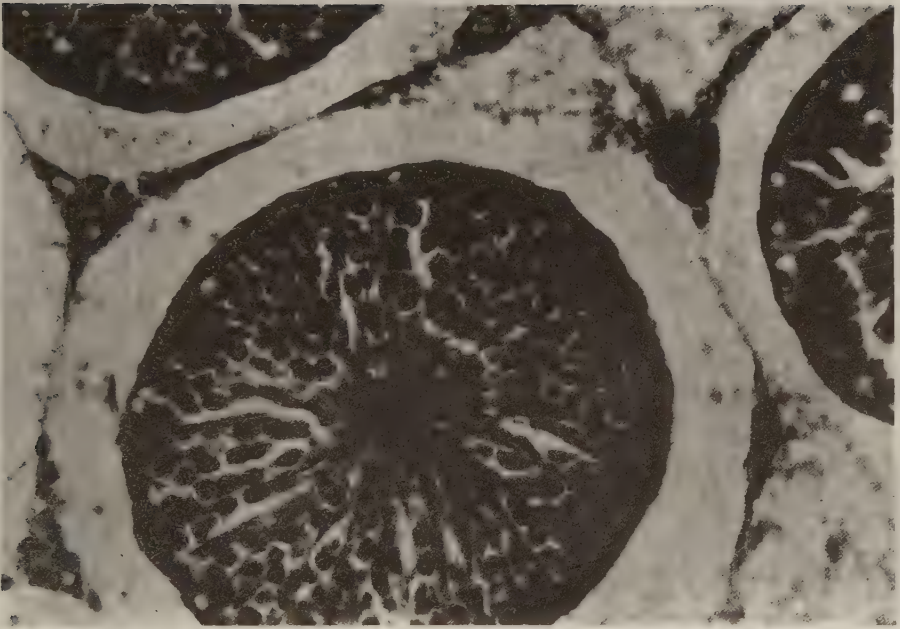


Abb. 18 Einfluß einer 14-tägigen Behandlung mit Östradiolbenzoat (1 mg/Tier/Tag) auf die Spermatogenese und Leydigzell-Morphologie von Ratten. Die beginnende Atrophie der Tubuli wird deutlich erkennbar an der Wellung der Tubuluswandungen. Deutlich ist auch bereits die gehemmte Spermiogenese. Reife Spermatozoen fehlen oder sind nur sehr selten zu beobachten. In den Lumina der Tubuli seminiferi finden sich amorphe Massen, die offenbar von zugrunde gegangenen Keimzellen herühren. Das Zwischenzellgewebe (Leydig'sche Zwischenzellen) ist ebenfalls atrophisch.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

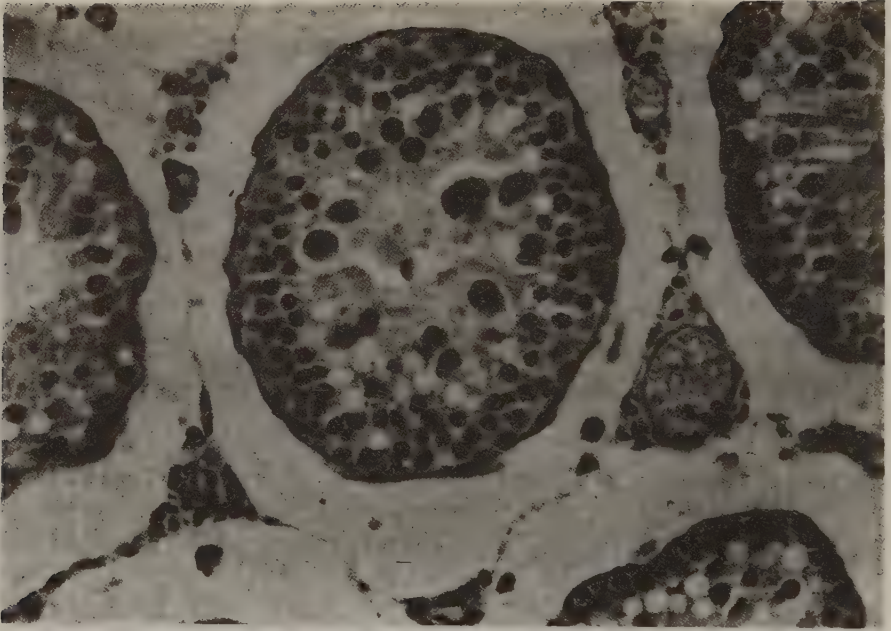


Abb. 19 Einfluß einer 4-wöchigen Behandlung mit Östradiolbenzoat (1 mg/Tier/Tag) auf die Spermatogenese und Leydigzell-Morphologie von Ratten.

Die Atrophie der Tubuli ist stark ausgeprägt.

Die Spermiogenese läuft nicht mehr ab; ein Zeichen für die gehemmte Reifeteilung. Die Spermatogenese

geht nur noch bis zu den pachytenen Spermatozyten.

In den Tubuli treten hin und wieder mehr- und vielkernige Riesenzellen auf - ein Zeichen für abge-

laufene degenerative Veränderungen im Keimepithel. Die Leydig'schen Zwischenzellen sind völlig atro-

phisch und ähneln Fibroblasten.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

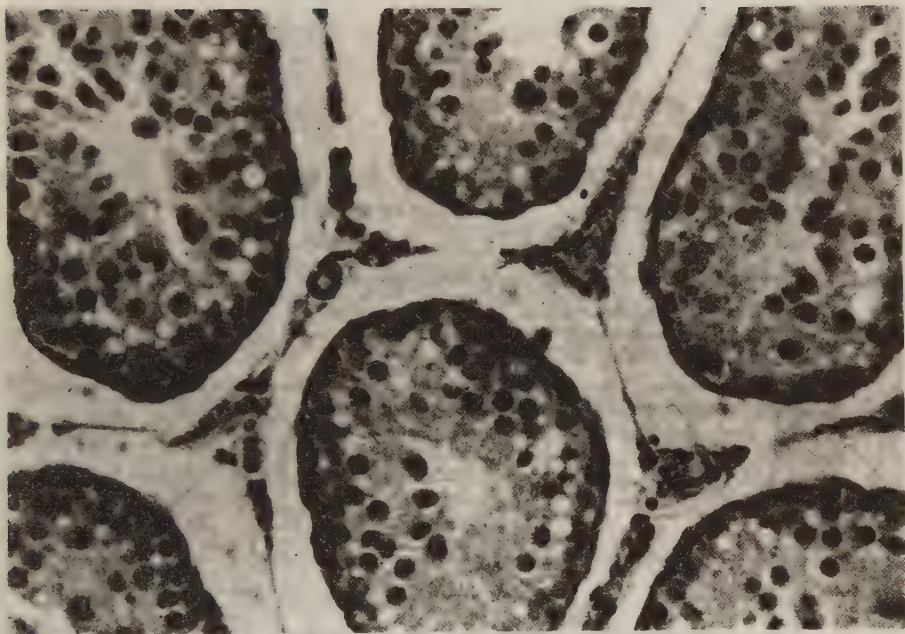


Abb. 20 Einfluß einer 7-wöchigen Behandlung mit Östradiolbenzoat (1 mg/Tier/Tag) auf die Spermatogenese und Leydigzell-Morphologie von Ratten. Es bietet sich fast das gleiche Bild wie nach 4-wöchiger Behandlung. Die Depopulation des Keimepithels ist noch weiter fortgeschritten.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

Tab. 6

Mittelwerte der Durchmesser der
Tubuli seminiferi

Östradiolbenzoat- Behandlungsdauer (Wochen)	Kontrolle (μ)	Behandelt (μ)
2	$247,32 \pm 2,73$	$171,18 \pm 2,68$
4	$255,26 \pm 2,2$	$131,66 \pm 1,54$
6	$250,8 \pm 2,27$	$121,52 \pm 0,97$
7	$250 \pm 1,2$	$122,30 \pm 1,02$

Diese Mittelwerte sind in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

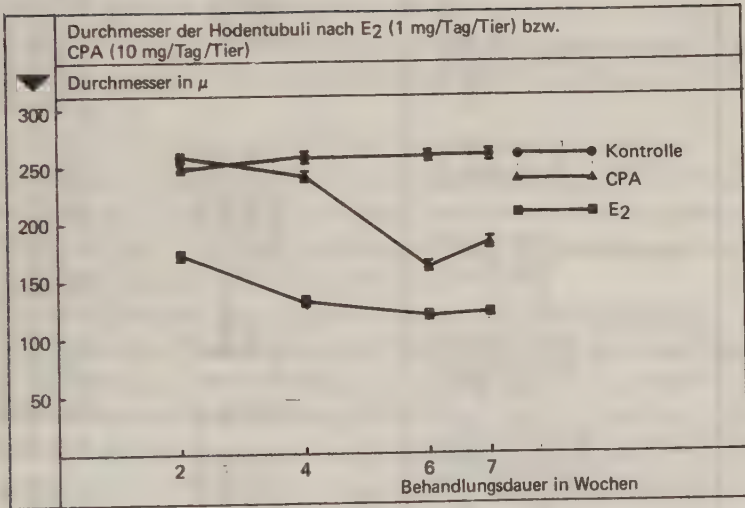


Abb. 21 Durchmesser der Hodentubuli nach Behandlung mit Östradiolbenzoat und Cyproteronacetat

Tab. 7

ERGEBNISSE DER U - TESTE FÜR DIE DURCHMESSER VON HODENTUBULI

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4 a		1	2	5	1	2	-	1	1	1	1
2 a	3.0		1	1	1	1	1	1	5	1	1
3 a	898.5	0.0			1	1	10	1	1	1	1
4 b	945.0	0.0	1205.0	-	1	1	-	1	1	1	1
2 b	0.0	92.0	0.0	0.0		1	1	1	1	1	1
3 b	889.5	0.0	450.0	519.0	0.0	699.5	1	1	1	1	1
4 c	1104.0	0.0	985.5	1050.0	0.0	0.0	0.0	1	1	1	1
2 c	0.0	17.0	0.0	0.0	541.5	0.0	0.0	0.0	1	1	1
3 c	0.0	943.5	0.0	0.0	9.0	0.0	0.0	0.0	1	1	1
2 d	0.0	20.5	0.0	0.0	585.0	0.0	0.0	1183.5	0.0	1	1
3 d	48.5	755.0	45.0	42.5	0.0	50.0	44.0	0.0	253.0	0.0	1

oben rechts: Testwahrscheinlichkeiten P
 unten links: Empirische U-Werte

Gruppe 4a = Kontr. 2 Wochen,
 Gruppe 2a = E₂ 2 Wochen,
 Gruppe 3a = C_{PA} 2 Wochen,
 Gruppe 4b = Kontr. 4 Wochen

Gruppe 2b = E₂ 4 Wochen,
 Gruppe 3b = C_{PA} 4 Wochen,
 Gruppe 4c = Kontr. 6 Wochen,
 Gruppe 2c = E₂ 6 Wochen

Gruppe 3c = C_{PA} 6 Wochen,
 Gruppe 2d = E₂ 7 Wochen,
 Gruppe 3d = C_{PA} 7 Wochen.

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
- 10 = Signifikanz auf dem 10 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
- 5 = Signifikanz auf dem 5 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
- 2 = Signifikanz auf dem 2 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
- 1 = Signifikanz auf dem 1 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
- * = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 %-Niveau zu klein

erreicht. Diese Befunde stimmen gut überein mit denen der Hodenhistologie sowie den Hodengewichten (s. dazu Tabelle 8 und Abbildung 20).

3.2.4 Beeinflussung der Hoden-, Prostata- und Samenblasen- gewichte

Die Hodengewichte sind bereits nach 2-wöchiger Behandlung gegenüber unbehandelten Kontrollen um 31 % erniedrigt. Nach 4- und 6-wöchiger Behandlung mit Östradiolbenzoat liegen die entsprechenden Prozentzahlen bei 78 resp. 82 %.

Noch empfindlicher reagieren die akzessorischen Geschlechtsdrüsen, Prostata und Samenblasen, auf die Östradiolbenzoat-Behandlung. Bereits nach 2-wöchiger Behandlung beträgt die Gewichtsabnahme der Prostata gegenüber unbehandelten Kontrollen 80 %.

Da die Funktion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen ausschließlich androgen-gesteuert ist, ist die Atrophie dieser Organe unter Östradiolbenzoat auf die gehemmte Androgen-Biosynthese zurückzuführen. Dafür sprechen auch die niedrigen Testosteron-Blutspiegel unter der Östradiolbenzoat-Behandlung (vergleiche dazu Abbildung 27) sowie die Leydigzellatrophie (vergleiche dazu Abbildungen 22, 23 und 24).

3.2.5 Hormonprofile (Serumkonzentrationen von FSH, LH und Testosteron

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den Abbildungen 25, 26 und 27 wiedergegeben. Am auffälligsten ist die Abnahme der Serum-Testosteron-Blutspiegel; bereits nach 14-tägiger Behandlung wird ein Tiefstwert erreicht. Die Testosteron-Serumkonzentrationen sinken von etwa 2500 auf 500 pg. Testosteronwerte von 500 pg entsprechen in etwa denen, wie sie nach Kastration zu beobachten

Tab. 8

Mittelwerte der Hoden-, Prostata- und Samen-
blasengewichte (mg) nach der Behandlung mit
Östradiolbenzoat

Behandlungs- dauer (Wo.)	Hodengew. (mg)	Samenblasen- gew. (mg)	Prostatagew. (mg)
2 Kontrolle	1808,57 $\pm$ 210 2571,42 $\pm$ 102,9	90 $\pm$ 6,54 588,57 $\pm$ 67,38	82,85 $\pm$ 6,80 408,57 $\pm$ 29,95
4 Kontrolle	660,20 $\pm$ 44 3010,85 $\pm$ 55,31	76,20 $\pm$ 5,80 899,71 $\pm$ 60,38	69,0 $\pm$ 9,9 616,85 $\pm$ 36,61
6 Kontrolle	543,33 $\pm$ 38,9 3112,14 $\pm$ 226	65,83 $\pm$ 3,74 1046,28 $\pm$ 74,46	46,66 $\pm$ 3,0 704,28 $\pm$ 44,62

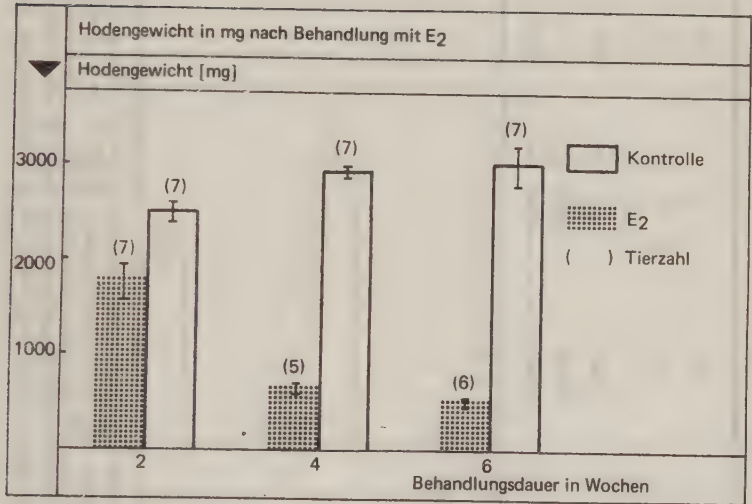


Abb. 22 Hodengewicht nach Behandlung mit Östradiolbenzoat

Tab. 2

ERGEBNISSE DER U - TESTE FÜR DIE HODENGEWICHTE

Gruppe	1	2	3	4	5	6
2 b		-	1	1	1	1
2 c	6.0					
4 b			1	1	1	1
4 a	0.0	0.0		2	-	1
4 c	0.0	0.0	5.0		10	5
2 a	0.0	0.0	21.0	11.0		1
	0.0	0.0	3.0	7.0	3.0	

oben rechts: Testwahrscheinlichkeiten P
 unten links: Empirische U-Werte

Gruppe 2b = E₂ 4 Wochen,
 Gruppe 2c = E₂ 6 Wochen,
 Gruppe 4b = Kontr. 4 Wochen,
 Gruppe 4a = Kontr. 2 Wochen,
 Gruppe 4c = Kontr. 6 Wochen,
 Gruppe 2a = E₂ 2 Wochen,

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
 10 = Signifikanz auf dem 10 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
 5 = Signifikanz auf dem 5 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
 2 = Signifikanz auf dem 2 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
 1 = Signifikanz auf dem 1 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
 * = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 %-Niveau zu klein

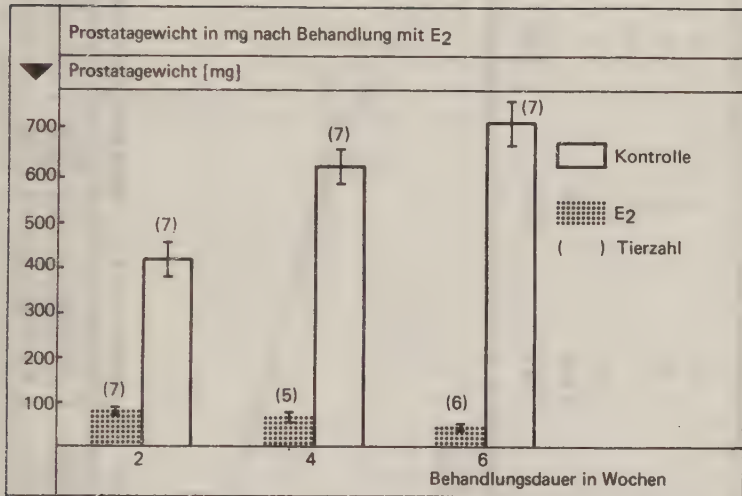


Abb. 23 Prostatagewicht nach Behandlung mit Östradiolbenzoat

Tab. 10

ERGEBNISSE DER U - TESTE FÜR PROSTATAGEWICHTE

Gruppe	1	2	3	4	5	6
2 b		-	1	1	1	-
2 c	5.5		1	1	1	1
4 b	0.0	0.0		1	-	1
4 a	0.0	0.0	0.0		1	1
4 c	0.0	0.0	14.0	1.0		1
2 a	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

oben rechts = Testwahrscheinlichkeiten p

unten links = Empirische U-Werte

Gruppe 2b = E₂ 4 Wochen,
 Gruppe 2c = E₂ 6 Wochen,
 Gruppe 4b = Kontr. 4 Wochen,
 Gruppe 4a = Kontr. 2 Wochen,
 Gruppe 4c = Kontr. 6 Wochen,
 Gruppe 2a = E₂ 2 Wochen,

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
 10 = Signifikanz auf dem 10 % -Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
 5 = Signifikanz auf dem 5 % -Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
 2 = Signifikanz auf dem 2 % -Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
 1 = Signifikanz auf dem 1 % -Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
 * = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 % -Niveau zu klein

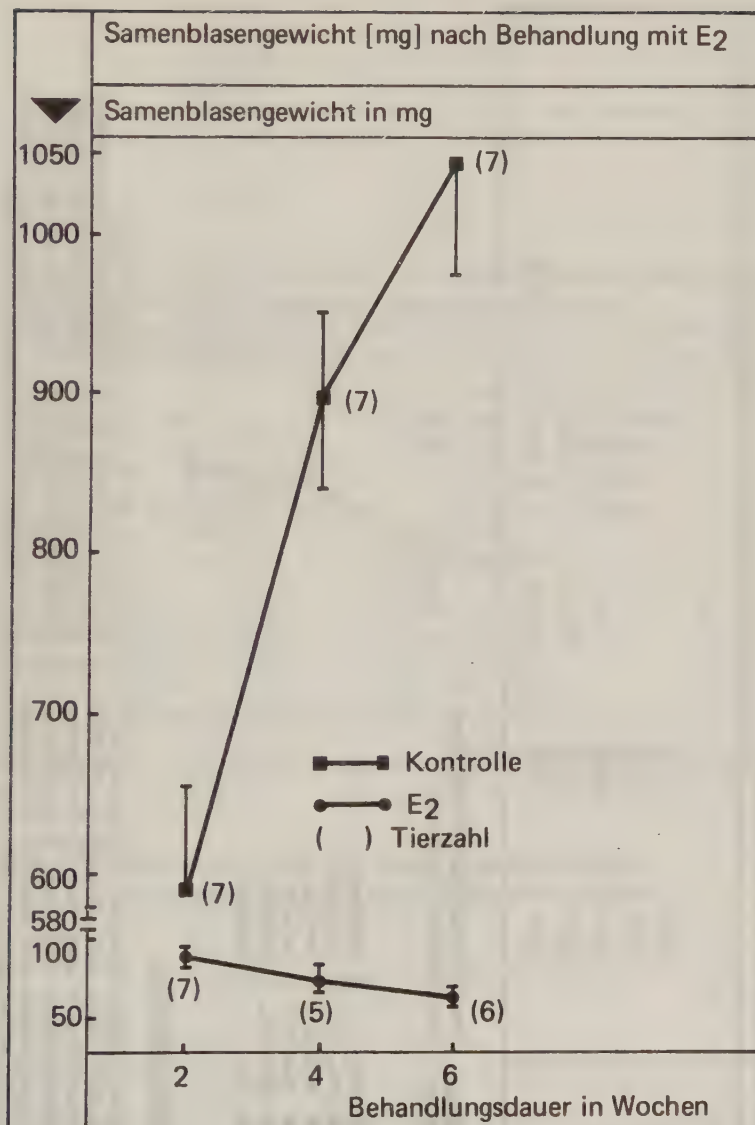


Abb. 24 Samenblasengewicht nach Behandlung mit Östradiolbenzoat

Tab. 11

ERGEBNISSE DER U - TESTE FÜR DIE SAMENBLASENGEWICHTE

Gruppe	1	2	3	4	5	6
2 b		-	1	1	1	-
2 c	7.0					
4 b			1	1	1	5
4 a	0.0	0.0				
4 c	0.0	0.0		1	-	1
2 a	0.0	0.0	4.0		1	1
		0.0	17.0	0.0		1
	8.0	6.0	0.0	0.0	0.0	

oben rechts: Testwahrscheinlichkeiten P
 unten links: Empirische U-Werte

Gruppe 2b =E₂ 4 Wochen,
 Gruppe 2c =E₂ 6 Wochen,
 Gruppe 4b =Kontr. 4 Wochen,
 Gruppe 4a =Kontr. 2 Wochen,
 Gruppe 4c =Kontr. 6 Wochen,
 Gruppe 4c =E₂ 2 Wochen,

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
 10 = Signifikanz auf dem 10 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
 5 = Signifikanz auf dem 5 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
 2 = Signifikanz auf dem 2 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
 1 = Signifikanz auf dem 1 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
 * = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 %-Niveau zu klein

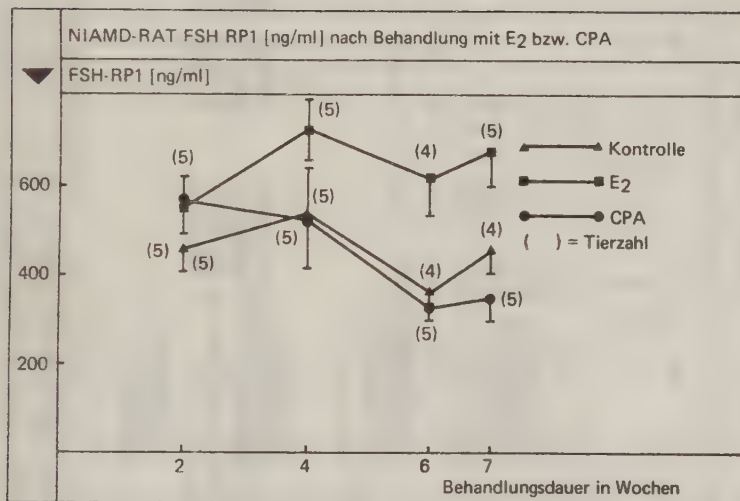


Abb. 25 NIAMD-RAT FSH RP1 nach Behandlung mit Östradiolbenzoat bzw. Cyproteronacetat

Tab. 12

ERGEBNISSE DER U - TESTE FÜR SERUM - FSH

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4 c	0.0	5	-	-	10	2	-	-	2	2	-	2
2 c	5.5	1.0	10	-	-	-	-	5	-	-	10	-
4 d	4.0	7.0	6.0	-	-	2	-	-	10	-	-	2
4 b	2.0	6.0	5.0	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-
3 b	0.0	6.0	5.0	4.5	4.0	10	-	10	-	-	-	-
4 a	4.0	3.0	6.5	11.0	11.0	0.0	1	1	-	10	1	-
3 c	10.0	1.0	7.0	4.5	9.0	0.0	4.0	10	-	10	-	2
3 a	0.0	6.0	2.0	9.5	9.0	4.5	6.0	1.5	5	10	-	1
2 a	0.0	8.0	4.0	10.0	12.0	2.5	12.0	3.0	9.0	-	10	-
3 d	10.0	2.0	8.0	5.0	7.0	0.0	8.0	12.5	3.0	6.0	-	10
2 d	0.0	8.0	0.0	7.0	5.0	8.0	1.0	0.0	10.0	4.0	0.0	1

oben rechts: Testwahrscheinlichkeiten p

unten links: Empirische U-Werte

Gruppe 4c = Kontr. 6 Wochen,
 Gruppe 2c = E₂ 6 Wochen,
 Gruppe 4d = Kontr. 7 Wochen,
 Gruppe 4b = Kontr. 4 Wochen,

Gruppe 3b = CPA
 Gruppe 2b = E₂
 Gruppe 4a = Kontr.
 Gruppe 3c = CPA
 Gruppe 4b = Kontr. 6 Wochen,

Gruppe 3a = CPA 2 Wochen,
 Gruppe 2a = E₂ 2 Wochen,
 Gruppe 3d = CPA 7 Wochen,
 Gruppe 2d = E₂ 7 Wochen,

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
 10 = Signifikanz auf dem 10 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
 5 = Signifikanz auf dem 5 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
 2 = Signifikanz auf dem 2 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
 1 = Signifikanz auf dem 1 %-Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
 * = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 %-Niveau zu klein

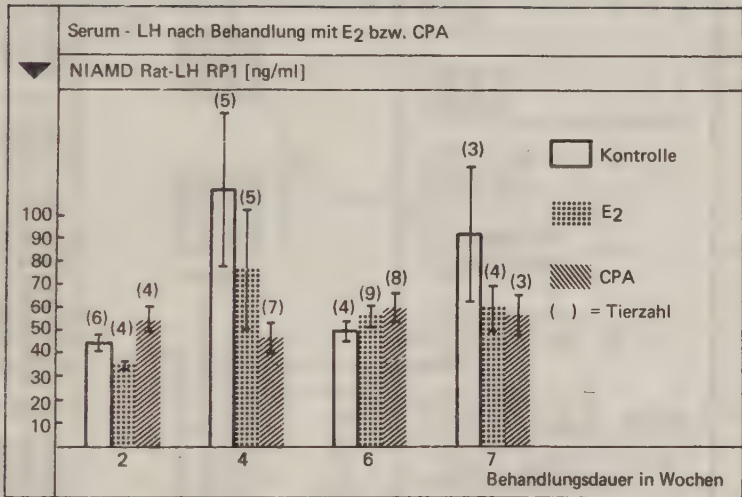


Abb. 26 Serum-LH nach Behandlung mit Östradiolbenzoat bzw. Cyproteronacetat

Tab. 13

ERGEBNISSE DER U - TESTE FÜR SERUM - LH

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4 d	2.0	-	10	10	-	-	-	-	10	10	-	5
3 d	0.0	4.0	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
4 c	0.0	0.0	0.5	10	10	-	-	-	-	-	-	-
2 a	0.0	0.0	0.5	0.5	10	5	-	-	5	5	2	1
2 d	2.0	5.0	5.5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
3 a	0.5	5.0	5.0	0.0	6.5	8.0	9.0	-	-	-	-	-
4 b	7.0	6.0	7.5	3.5	7.5	8.0	10.5	15.0	-	-	-	-
2 b	5.0	6.0	9.0	4.0	9.0	6.0	11.5	16.0	-	-	-	-
4 a	1.5	4.0	9.0	1.5	6.5	6.0	14.5	19.0	17.5	-	-	-
3 b	2.0	4.0	8.5	2.5	6.5	14.5	18.0	15.5	15.5	16.5	-	-
3 c	6.0	11.0	12.5	1.5	14.0	16.5	-	-	-	-	-	-
2 c	2.0	11.0	15.5	0.0	15.0	16.5	-	-	-	11.0	35.5	-

oben rechts: Testwahrscheinlichkeiten P
unten links: Empirische U-Werte

Gruppe 4d = Kontr. 7 Wochen, Gruppe 3d = CPA 7 Wochen, Gruppe 4c = Kontr. 6 Wochen, Gruppe 2a = E₂ 2 Wochen, Gruppe 4a = Kontr. 2 Wochen, Gruppe 3b = CPA 4 Wochen, Gruppe 3c = CPA 6 Wochen, Gruppe 2c = E₂ 6 Wochen,

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
10 = Signifikanz auf dem 10 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
5 = Signifikanz auf dem 5 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
2 = Signifikanz auf dem 2 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
1 = Signifikanz auf dem 1 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
• = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 % - Niveau zu klein

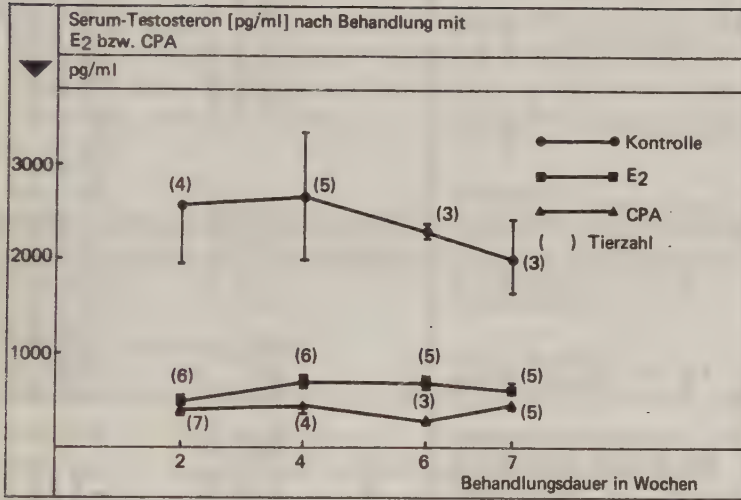


Abb. 27 Serum-Testosteron nach Behandlung mit Östradiolbenzoat bzw. Cyproteronacetat

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4 c		10	-	10	-	-	5	5	5	5	5	2
3 c	0.0	3.0	10	10	10	5	5	5	5	5	5	2
4 d	0.0	0.0	0.0	10	-	-	5	5	5	5	5	2
3 b	0.0	0.0	0.0	0.0	5	2	-	-	-	10	-	-
4 a	6.0	0.0	5.0	0.0	-	-	2	2	2	1	1	1
4 b	5.0	0.0	7.0	0.0	9.5	-	1	1	1	1	1	1
2 c	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.0	-	5	-	1	5
2 d	0.0	0.0	0.0	3.5	0.0	0.0	0.0	5.0	-	1	-	-
3 d	0.0	0.0	0.0	8.0	0.0	0.0	12.0	10.5	0.0	-	-	-
2 b	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	1.0	7.5	12.5	1.0	1	1
2 a	0.0	0.0	0.0	9.0	0.0	0.0	1.0	5.0	13.5	1.0	12.0	-
3 a	0.0	0.0	0.0	12.0	0.0	0.0	2.0	5.0	13.5	1.0	12.0	-

oben rechts: Testwahrscheinlichkeiten P

unten links: Empirische U-Werte

Gruppe 4c = Kontr. 6 Wochen,
 Gruppe 3c = CPA 6 Wochen,
 Gruppe 4d = Kontr. 7 Wochen,
 Gruppe 3b = CPA 4 Wochen,

Gruppe 4a = Kontr. 2 Wochen,
 Gruppe 4b = Kontr. 4 Wochen,
 Gruppe 2c = E₂ 6 Wochen,
 Gruppe 2d = E₂ 7 Wochen,

Gruppe 3d = CPA 7 Wochen,
 Gruppe 2b = E₂ 4 Wochen,
 Gruppe 2a = E₂ 2 Wochen,
 Gruppe 3a = CPA 2 Wochen,

SIGNIFIKANZSCHLÜSSEL:

- = Kein signifikanter Unterschied (P größer 0.10 / zweiseitiger Test)
 10 = Signifikanz auf dem 10 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.10 / zweiseitiger Test)
 5 = Signifikanz auf dem 5 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.05 / zweiseitiger Test)
 2 = Signifikanz auf dem 2 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.02 / zweiseitiger Test)
 1 = Signifikanz auf dem 1 % - Niveau (P kleiner/gleich 0.01 / zweiseitiger Test)
 * = Stichprobenumfang für eine Entscheidung auf dem 10 % - Niveau zu klein

sind, d.h. man kann aus diesen Werten entnehmen, daß die Leydigzellfunktion vollständig zum Erliegen gekommen ist.

Weniger deutlich ausgeprägt ist der Verlauf der Serumkonzentrationen von FSH und LH. Während beim FSH sogar nach 6- und 7-wöchiger Behandlung keine deutliche Abnahme der Konzentrationen gegenüber unbehandelten Kontrollen erkennbar ist, sind die Werte für LH nicht signifikant. Es wird in der DISKUSSION darauf einzugehen sein, warum trotz annähernd normaler LH-Werte die Testosteronsynthese in den Leydigzellen nicht mehr abläuft.

3.3 FSH-Bindungskapazität und Morphologie von Rattenhoden sowie Hormonprofile nach Behandlung mit Cyproteronacetat

3.3.1 FSH-Bindungskapazität

Bereits nach 2-wöchiger Behandlung mit Cyproteronacetat ist die FSH-Bindungskapazität gegenüber unbehandelten Kontrollen signifikant erniedrigt, wie Abbildung 16 zeigt. Die Werte bleiben niedrig über den ganzen Zeitraum der Behandlung. Die Behandlung mit Cyproteronacetat reduziert die FSH-Bindungskapazität bei weitem nicht in dem Ausmaß wie die Behandlung mit Östradiolbenzoat. Dieser Befund korreliert gut mit den histologischen Veränderungen im Hoden. Die Östradiolbenzoat-Behandlung führte zu einer weit ausgeprägteren Atrophie der Tubuli und Regression des Keimepithels als die Gabe von Cyproteronacetat (vergleiche dazu Abbildungen 20 und 21 mit Abbildungen 21 und 30).

3.3.2 Hodenmorphologie

Eine beginnende Tubulus-Atrophie ist bereits nach 14-tägiger Behandlung erkennbar (Abbildung 28). Die Tubuluswandungen sind gewellt, im Keimepithel finden sich nur

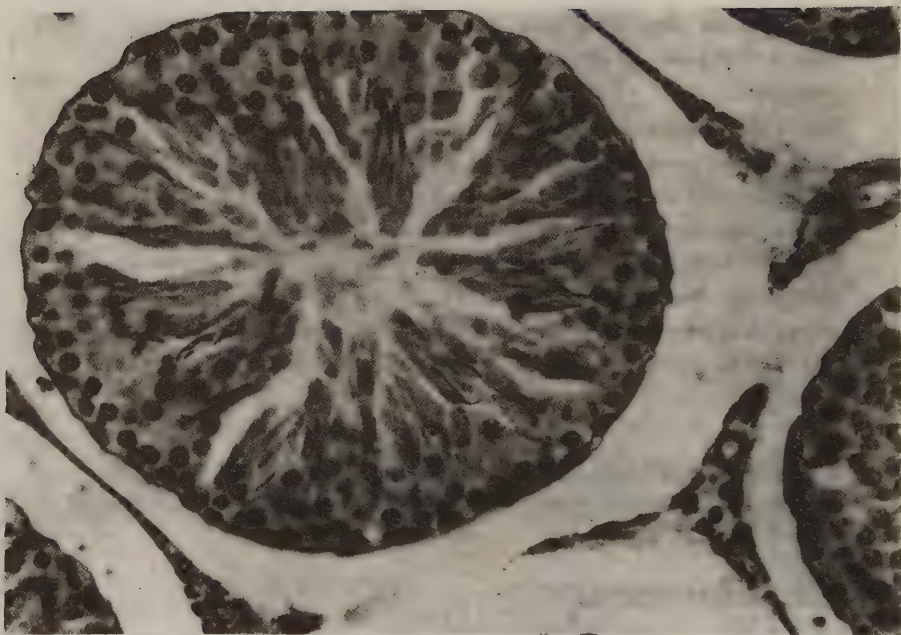


Abb. 28 Einfluß einer 2-wöchigen Behandlung mit Cypro-
teronacetat (10 mg/Tier/Tag, subkutan) auf die
Spermatogenese und Leydigzell-Morphologie von
Ratten.

Anzeichen einer beginnenden Atrophie der Tubuli seminiferi sind an der Wellung der Tubuluswandungen zu erkennen. Das Keimepithel zeigt Anzeichen einer Depopulation. Es sind weniger reife Spermatozoen vorhanden als bei den Kontrolltieren. Die Reifeteilung läuft noch ab, u.a. erkennbar an dem Auftreten von Mitosen. Die Leydig'schen Zwischenzellen weisen Anzeichen einer Atrophie auf.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

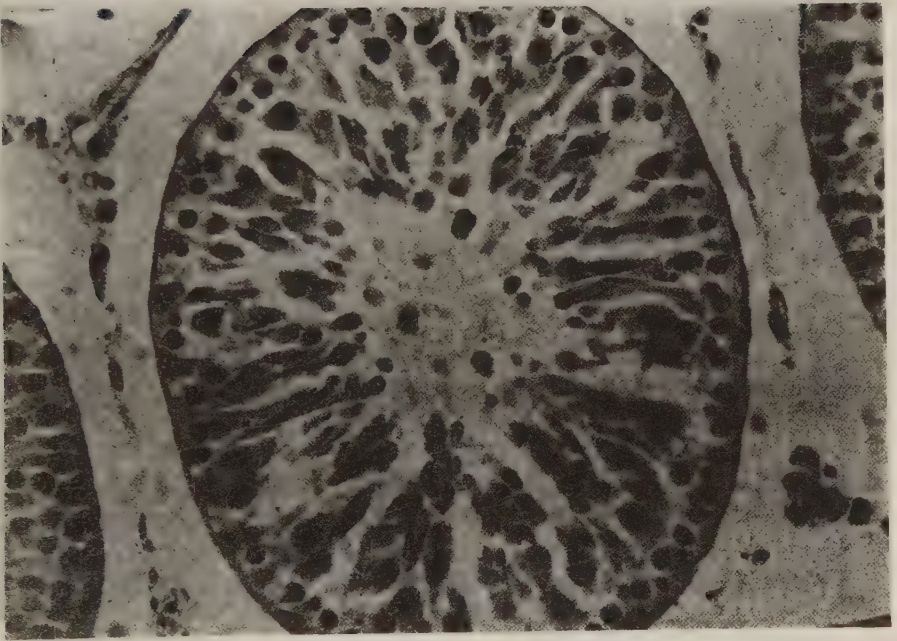


Abb. 29

Einfluß einer 4-wöchigen Behandlung mit Cypro-
teronacetat (10 mg/Tier/Tag, subkutan) auf die
Spermatogenese und Leydigzell-Morphologie von
Ratten.

Es bietet sich ein ähnliches Bild wie nach 2-
wöchiger Behandlung. Man findet noch alle Stadien
der Spermatogenese und Spermiogenese, allerdings
ist zumindest die Spermiogenese stark reduziert
(weniger reife Spermatozoen und Spermatiden).
Die Zwischenzellen sind atrophisch.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

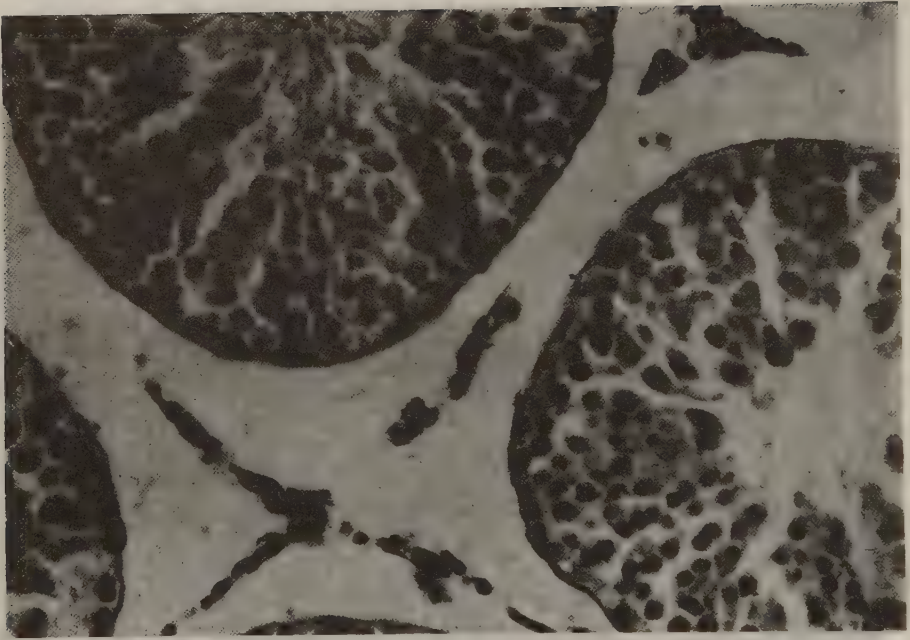


Abb. 30

Einfluß einer 7-wöchigen Behandlung mit Cypro-
teronacetat (10 mg/Tier/Tag, subkutan) auf die
Spermatogenese und Leydigzell-Morphologie von
Ratten.

Nur noch ganz vereinzelt sind in den Tubuli
seminiferi reife Spermatozoen zu beobachten.
Die Spermiogenese ist also unvollständig. Dagegen
läuft die Reifeteilung noch ab. Die Leydig'schen
Zwischenzellen sind atrophisch.

Vergrößerung: 400 x

Färbung: PAS Haematoxylin Lichtgrün

noch wenige reife Spermatozoen. Auch die Leydig'schen Zwischenzellen zeigen Anzeichen einer beginnenden Atrophie. Ein ähnliches Bild zeigt sich nach 4-wöchiger Behandlung (Abbildung 29).

Nach 7-wöchiger Behandlung mit Cyproteronacetat finden sich nur noch ganz vereinzelt reife Spermatozoen in den Tubuli. Die Reifeteilung läuft jedoch noch ab, offenbar liegt bei dieser Dosis nur eine Störung der Spermiogenese vor. Die Leydigzellen zeigen alle Anzeichen einer Atrophie.

3.3.3 Hodenmorphometrie (Durchmesser der Tubuli seminiferi)

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind der Abbildung 21 zu entnehmen. Nach 6- und 7-wöchiger Behandlung mit Cyproteronacetat sind die Durchmesser der Tubuli seminiferi gegenüber den Kontrollen hochsignifikant erniedrigt. Die Tubulus-Atrophie ist jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt wie nach Gabe von Östradiolbenzoat. Dieser Befund korreliert gut mit den histologischen Befunden (vergleiche dazu Abbildungen 21 und 30 mit Abbildungen 21 und 20).

3.3.4 Hormonprofile (Serumkonzentrationen von FSH, LH und Testosteron)

Die Ergebnisse der hormon-analytischen Untersuchungen sind in den Abbildungen 25, 26 und 27 dargestellt. Am auffälligsten ist die Abnahme der Testosteronkonzentrationen von etwa 2000 bis 2500 pg/ml auf ca. 500 bis 700 pg/ml. Damit erreichen die Testosteronkonzentrationen unter der Behandlung mit Cyproteronacetat beinahe Werte von Kastraten. Der supprimierende Effekt von Östradiolbenzoat auf die endogene Testosteron-Biosynthese, d.h. die inkretorische Leydigzell-Funktion entspricht etwa dem von Cyproteronacetat, wie Abbildung 27 zeigt. Auch die

Tab. 15

Mittelwerte der Durchmesser
der Tubuli seminiferi
nach der Cyproteronacetat - Behandlung

Behandlungs- dauer (Wo.)	Kontrolle	Behandlung
2	247,32 $\pm$ 2,72	256 $\pm$ 1,90
4	255,32 $\pm$ 2,19	239,12 $\pm$ 1,76
6	251,2 $\pm$ 2,2	164,78 $\pm$ 1,34
7	251,2 $\pm$ 2,2	184,4 $\pm$ 2,31

FSH-Konzentrationen im Serum unterscheiden sich während der Dauer der Behandlung nicht signifikant von denen unbehandelter Kontrollen (Abbildung 25). Die LH-Konzentrationen zeigen ebenfalls keine signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen (Abbildung 26). Darauf wird in der DISKUSSION näher einzugehen sein. Es zeigt sich jedenfalls nicht zu allen Tötungsterminen eine Abnahme der LH-Serum-Konzentrationen gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

IV.

DISKUSSION

Die durchgeführten Untersuchungen sollten in erster Linie dazu dienen, einen Beitrag zur physiologischen Bedeutung des follikel-stimulierenden Hormons - vor allem für die Initiierung der Spermatogenese - zu liefern.

Zweitens erhofften wir uns präzisere Aussagen darüber, worauf die spermatogenese-hemmende Wirkung von Steroidhormonen (untersucht wurden Östradiolbenzoat und Cyproteronacetat) beruht, d.h. ob diese Hormone direkt am Hoden angreifen oder nur via Hemmung der Gonadotropinsekretion spermatogenese-hemmend wirken.

In der EINLEITUNG wurde schon kurz darüber berichtet, daß wahrscheinlich die Sertolizellen das Zielorgan für FSH sind. Hier seien noch einmal alle wesentlichen neueren Befunde, die dies belegen, aufgeführt.

Mit tritium-markiertem FSH (VAITUKAITIS, HAMMOND, ROSS, HICKMAN & ASHWELL 1971) konnte in vitro bei Inkubation von 16 Tage alten Rattenhoden gezeigt werden, daß dieses Hormon spezifisch gebunden wird. In Organen wie der Lunge, der Leber, der Milz, den Muskeln, die keine Zielorgane für FSH sind, erfolgte keine Bindung (MEANS & VAITUKAITIS 1972). Die Bindung ist maximal bei Temperaturen von 32 bis 37° C. Im Hoden immaturer Ratten wird mehr FSH gebunden als im Hoden erwachsener Tiere (MEANS 1975)*.

In anderen Versuchen konnte dann nachgewiesen werden, daß FSH nur an die Tubuli seminiferi (MEANS & VAITUKAITIS 1972),

* Es wird nur dann eine höhere FSH-Bindung im Hoden immaturer Ratten gefunden, wenn man die Werte auf mg Protein bezieht, nicht aber wenn man auf das Hodengewicht umrechnet.

nicht aber an die Leydigzellen (MEANS 1973) bindet. Wie andere Peptidhormone auch, bindet FSH nur an die Membranfraktionen (MEANS 1973) der Tubuli seminiferi. Offenbar entfaltet dieses Hormon seine biologische Wirkung, ohne in die Zelle selbst einzutreten.

Untersuchungen am kryptorchen Hoden, am Hoden hypophysectomierter Tiere sowie an röntgen-bestrahlten Hoden mit Verlust des Keimepithels haben dann wahrscheinlich gemacht, daß neben Spermatogonien nur Sertolizellen für die FSH-Bindung in Frage kommen. Da auch die Hoden von präpuberal röntgen-bestrahlten Tieren mit völligem Verlust des Keimepithels - einschließlich der Gonozyten - noch FSH zu binden vermögen, kann kein Zweifel mehr daran bestehen, daß die Sertolizellen Zielorgan für FSH sind (MEANS & HUCKINS 1974; MEANS & TINDALL 1975). In allerjüngster Zeit konnte auch in reinen in vitro Kulturen von Sertolizellen eine spezifische Bindung von FSH nachgewiesen werden. FSH stimuliert die Bindung von zyklischem Adenosinmonophosphat (c-AMP), dem Mediator der biologischen Wirkung fast aller tropen Hormone (STEINBERGER, ELKINGTON, SANBORN, STEINBERGER, HEINDEL & LINDSEY 1975; STEINBERGER 1975; FRITZ, LOUIS, TUNG, GRISWOLD, ROMMERTS & DORRINGTON 1975).

In der EINLEITUNG wurde darauf hingewiesen, daß die Synthese und Sekretion des androgen-bindenden Proteins (ABP) eine ganz spezifische Leistung der Sertolizelle ist (s. Übersicht bei HANSSON, RITZEN, FRENCH & NAYFEH 1975). Im übrigen war es auch möglich, in Sertolizellkulturen durch FSH-Zusatz die ABP-Produktion zu stimulieren (STEINBERGER 1975; FRITZ, LOUIS, TUNG, GRISWOLD, ROMMERTS & DORRINGTON 1975).

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die FSH-Bindungskapazität - und damit wohl auch die FSH-abhängige ABP-Produktion - mit zunehmendem Lebensalter ansteigt. Ebenfalls ist eine Zunahme der Hodengewichte und Tubulusdurchmesser mit zunehmendem Alter zu beobachten.

Die Testosteronkonzentrationen im Serum steigen auch mit zunehmendem Alter an. Daraus kann man ableiten, daß das Fortschreiten der Spermatogenese und damit das Wachstum der Hoden androgen-abhängig ist und erst in Gang kommt, wenn intratestikulär genügend hohe Androgenkonzentrationen gewährleistet sind, was wiederum abhängig ist von der sekretorischen Leistung (ABP-Produktion) der Sertolizellen.

Noch höhere Bindungskapazitäten finden sich bei Eintritt in die Geschlechtsreife bei 56 Tage alten Tieren.

Man kann aus diesen Befunden und den Untersuchungen anderer ableiten, daß FSH zumindest für die Initiierung der Spermatogenese essentiell ist. Wahrscheinlich unterhält FSH - im Zusammenwirken mit Testosteron - auch nach Eintritt in die Geschlechtsreife die sekretorische Sertolizellfunktion.

Die durchgeführten Untersuchungen mit Östradiolbenzoat und Cyproteronacetat haben gezeigt, daß sowohl die Behandlung mit Östradiolbenzoat als auch die Gabe des Antiandrogens zu einer drastischen Abnahme der FSH-Bindungskapazität in Hodenhomogenaten führen. Dabei ist die Abnahme der FSH-Bindungskapazität nach Gabe von Östradiolbenzoat sehr viel ausgeprägter als bei Behandlung mit Cyproteronacetat. Bereits nach 2-wöchiger Behandlung werden schon Tiefstwerte erreicht. Damit einher geht die Hemmung der Spermatogenese und Spermiogenese. Das Ausmaß der Spermatogenesehemmung ist nach Östradiolbenzoat-Behandlung ausgeprägter als nach Gabe von Cyproteronacetat.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die spermatogenesehemmende Wirkung von Steroidhormonen möglicherweise doch auf eine direkte testikuläre Wirkung zurückzuführen ist. Man kann davon ausgehen, daß die Bindung eines Hormons an spezifische Rezeptoren in den Erfolgsorganen die Voraus-

setzung ist für die Auslösung der biologischen Wirkung, d.h. letztlich für die Vorgänge der Transkription und Translation (Übersicht dazu s. NEUMANN & SCHENCK 1975).

Wie gezeigt werden konnte, ist das Zielorgan für FSH die Sertolizelle. Eine herabgesetzte FSH-Bindungskapazität sollte zu einer verminderten sekretorischen Aktivität der Sertolizelle führen und damit zu einem Mangel an ABP. Dies wiederum müßte ein Androgendefizit im Hoden und Nebenhoden nachsichziehen. Allerdings waren in den hier berichteten Untersuchungen auch die Testosteron-Serumspiegel deutlich herabgesetzt, weniger die LH-Werte. Die antigonadotrope Wirkung kann also als Ursache für die Hemmung der Spermatogenese prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Aber immerhin ist durchaus denkbar, daß die spermatogenese-hemmende Wirkung von Östradiolbenzoat und Cyproteronacetat zumindest zum Teil auf die herabgesetzte FSH-Bindungskapazität der Sertolizellen zurückzuführen ist.

SCHENCK und NEUMANN (1976) konnten diese Überlegung zum Teil bestätigen. Sie haben erwachsene Ratten über 6 Wochen mit ansteigenden Dosen von Cyproteronacetat behandelt. Gemessen wurden die Testosteron-, FSH- und LH-Serumspiegel sowie der Gehalt an androgen-bindendem Protein in den Nebenhodenköpfen. Es zeigte sich, daß erst dann eine Abnahme der Hodengewichte mit Hemmung der Spermatogenese auftritt, wenn auch die ABP-Konzentrationen absinken. Zwischen dem ABP-Gehalt und dem Grad der Hodengewichtsabnahme bestand eine statistisch zu sichernde Korrelation. Bei den geprüften Dosen bewegten sich die gemessenen Hormonwerte für FSH, LH und Testosteron im Normalbereich. Dieser Befund spricht dafür, daß die antigonadotropen Eigenschaften von Cyproteronacetat für die spermatogenese-hemmende Wirkung allenfalls zusätzlich von Bedeutung sein könnten. Wahrscheinlich macht sich die antigonadotrope Wirkung erst bei höheren Dosen bemerkbar.

Die in dieser Arbeit berichtete herabgesetzte FSH-Bindungskapazität in Hodenhomogenaten ist wahrscheinlich die Ursache für eine verminderte Produktion des androgenbindenden Proteins, und damit letztlich Ursache für die gestörte Spermatogenese. Cyproteronacetat führt also letztlich zu einer funktionellen Schädigung der Sertolizellen.

Ob dieser Mechanismus der Spermatogenesehemmung nur für Cyproteronacetat resp. ähnliche Antiandrogene zutrifft, oder ob andere Hormone - und Noxen überhaupt -, die die Spermatogenese stören, ihre Effekte ebenfalls z. T. über eine Schädigung der Sertolizellen ausüben, bedarf sicher noch weiterer Untersuchungen.

Wie TRAORE (1977) zeigen konnte, führen auch völlig andere Noxen - wie Temperaturerhöhung (Kryptorchismus) und Cadmiumchlorid-Behandlung - zu einer herabgesetzten FSH-Bindungskapazität der Sertolizellen. Insofern könnte es sich tatsächlich um ein ganz allgemeines Phänomen handeln.

Östrogene greifen wahrscheinlich nicht nur an den Sertolizellen, sondern direkt auch an den Leydig'schen Zwischenzellen an. Wie in der EINLEITUNG schon kurz angedeutet, weiß man heute, daß Leydigzellen nicht nur Rezeptoren für Proteohormone, sondern auch solche für Steroide - u.a. für Östrogene - besitzen. So konnten STUMPF (1969) sowie SAR, und Mitarbeiter (1975) in autoradiographischen Untersuchungen nach Gabe von radioaktivem Östradiol an immaturren Ratten eine spezifische Lokalisation von Radioaktivität in den Zellkernen der Leydigzellen nachweisen.

In neueren Untersuchungen gelang schließlich der direkte Nachweis sowohl von cytoplasmatischen als auch nukleären Rezeptoren in den Leydig'schen Zwischenzellen (MULDER, BRINKMANN, LAMERS-STÄHLHOFEN, MECHIELSEN & VAN DER MOLEN 1973; MULDER, VAN BEURDEN-LAMERS, DE BOER, BRINKMANN &

VAN DER MOLEN 1974).

Wie andere Steroid-Rezeptor-Komplexe, so erfährt auch der Östradiol-Rezeptor-Komplex in Leydigzellen eine Translokation in die Zellkerne, aus denen er mittels 0.4 M KCl-Lösung extrahiert werden kann.

MULDER und Mitarbeiter (1973) konnten zeigen, daß nicht nur bei Ratten, sondern auch bei Mäusen und Affen Östradiolrezeptoren in den Leydigzellen vorkommen. Auch beim Manne wurde die Existenz von Östradiol-Rezeptoren in den Leydig'schen Zwischenzellen wahrscheinlich gemacht (HANSSON & RITZÉN 1977).

Möglicherweise regulieren Östrogene unter physiologischen Bedingungen die Ansprechbarkeit (Empfindlichkeit) der Leydigzellen auf LH. Darauf deuten Untersuchungen von FRÖHLICH und SCHENCK (1977) hin.

Bei hypophysektomierten Ratten, die mit Östradiolbenzoat vorbehandelt wurden, war die Ansprechbarkeit auf HCG (human chorionic gonadotrophin), gemessen am Anstieg der Androgenkonzentrationen im Blut, herabgesetzt.

Die spermatogenese-hemmende Wirkung von Östrogenen kann also verschiedene Ursachen haben bzw. es können verschiedene Mechanismen involviert sein, und zwar kommen in Frage:

(1) keine Hemmung der hypophysären Gonadotropinsekretion.

Dies wurde in den vorgelegten Untersuchungen - zumindest für das FSH - auch nachgewiesen. Weniger aussagekräftig sind die Befunde für das LH*.

* Es sei am Rande erwähnt, daß basal gemessene LH-Spiegel, wie es in vorliegender Untersuchung aus technischen Gründen nicht anders möglich war, keine allzu große Aussagekraft besitzen. Wahrscheinlich hängt nämlich die Aktivität (Androgenbiosynthese) der Leydigzellen weniger von den basalen Spiegeln als von dem sog. "LH-Spiking" ab. Letzteres kann aber nur ermittelt werden, wenn die Blutabnahmen in kurzen Abständen über einen längeren Zeitraum erfolgen.

- (2) Eine herabgesetzte Bindungskapazität für FSH und damit letztlich eine funktionelle Schädigung der Sertolizelle.
- (3) Eine herabgesetzte Testosteronbiosynthese, zurückzuführen auf eine verminderte Ansprechbarkeit auf LH.

Es muß offen bleiben, welchem dieser Mechanismen die entscheidende Rolle zukommt. In jedem Falle ist aber letztlich die Sertolizelle betroffen, weil die Sertolizellfunktion FSH- und testosteron-abhängig ist (HANSSON, RITZEN, FRENCH & NAYFEH 1975).

V.

ZUSAMMENFASSUNG

Die eigenen Untersuchungen hatten zum Ziel, erstens einen Beitrag zur physiologischen Bedeutung des follikelstimulierenden Hormons für die Spermatogenese zu liefern. Zweitens sollte untersucht werden, ob die spermatogenesehemmende Wirkung von Östrogenen und Antiandrogenen (untersucht wurde Cyproteronacetat) auf einer Beeinflussung der Sertolizellfunktion beruhen könnte. Es wurde davon ausgegangen, daß die Sertolizellen das testikuläre Zielorgan für das follikel-stimulierende Hormon sind und daß die Ermittlung der FSH-Bindungskapazitäten in Rattenhodenhomogenaten, in Kombination mit einigen anderen mehr konventionellen Parametern, Aussagen im Sinne der Zielvorstellung erlauben. Folgende Methoden gelangten zur Anwendung:

- (1) Bestimmung der FSH-Bindungskapazitäten in Rattenhodenhomogenaten;
- (2) Ermittlung der Serumblutspiegel für FSH, LH und Testosteron;
- (3) Histologische und histomorphometrische Methoden;
- (4) Organgewichtsbestimmungen.

Es wurden zwei Hauptversuche durchgeführt. In einem Versuch sollten die genannten Parameter von der Geburt bis zum Eintritt in die Pubertät ermittelt werden. In dem zweiten Versuch an erwachsenen Ratten wurde der Einfluß von Östradiolbenzoat und Cyproteronacetat auf die genannten Parameter untersucht.

Es konnte gezeigt werden, daß die FSH-Bindungskapazität von Rattenhodenhomogenaten von der Geburt bis zum Eintritt in die Pubertät zunimmt. Ein Anstieg der FSH -

Bindungskapazitäten liegt vor zwischen dem 27. und 33. Lebenstag. In dieser Phase beginnt die Reifeteilung, und damit setzt der Vorgang der Spermiogenese ein, wie auch aus der Hodenmorphologie und den Hodengewichten ersichtlich wird. Höchstwerte werden erst wieder mit Eintritt in die Pubertät - im Alter von etwa 56 Tagen - erreicht.

Die FSH-Serumspiegel sind bereits zu einem früheren Zeitpunkt recht hoch, ohne daß eine direkte Korrelation mit den FSH-Bindungskapazitäten vorliegt. LH und Testosteron steigen erst in der peripuberalen Phase deutlich an.

Diese Untersuchungen stützen die Vorstellung, daß das follikel-stimulierende Hormon zumindest für die Initiierung der Spermatogenese essentiell ist.

Sowohl Östradiolbenzoat als auch Cyproteronacetat führen zu einer Abnahme der FSH-Bindungskapazität; damit einher geht eine Hemmung der Spermatogenese.

Es wird wahrscheinlich gemacht, daß die Hemmung der Spermatogenese durch das Antiandrogen Cyproteronacetat wahrscheinlich auf diesen Mechanismus zurückzuführen ist. Bedingt durch eine herabgesetzte FSH-Bindungskapazität kommt es zu einer verminderten Produktion des androgenbindenden Proteins (ABP) in den Sertolizellen und damit zu einem Androgendefizit in den Tubuli seminiferi, was die Störung der Spermatogenese zur Folge hat.

Bei Anwendung höherer Dosen mag die antigonadotrope Wirkung des Antiandrogens als weiterer Grund für die Hemmung der Spermatogenese ebenfalls in Frage kommen.

Für Östrogene muß als Ursache für die Spermatogenesehemmung neben den genannten Mechanismen noch eine direkte Wirkung auf die Leydigzellfunktion im Sinne einer herabgesetzten Empfindlichkeit für LH mitdiskutiert werden.

Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß möglicherweise bei allen

Hormonen, Pharmaka und Noxen, die die Spermatogenese hemmen, letztlich primär eine funktionelle Störung der Sertolizellfunktion zugrunde liegt.

S U M M A R Y

The own investigations were aimed at: Firstly, to contribute to the physiologic importance of FSH for spermatogenesis and secondly, to investigate whether the antispermatogenic effect of estrogens and antiandrogens (cyproterone acetate was used) might be caused by an influence on Sertoli cell function. Starting point was the hypothesis that the Sertoli cells are the testicular target organ for FSH, and that the evaluation of binding capacities for FSH in rat testis homogenates, together with some other rather conventional methods, would allow to make statements being in line with the working hypothesis.

The following methods were employed:

- (1) Determination of the binding capacities for FSH in rat testis homogenates,
- (2) Evaluation of the blood serum levels of FSH, LH and testosterone,
- (3) Histologic and histomorphometric methods,
- (4) Organ weights.

Two principal investigations were carried out. In one assay, the above parameters were measured from birth to puberty. The second assay was done in order to investigate the influence of estradiol benzoate and cyproterone acetate on these parameters in adult rats.

It could be demonstrated that the FSH binding capacity is increasing from birth to puberty. A rise of the binding capacities for FSH occurs between the 27th and 33rd day of life. The maturation division commences in this

phase whereby the process of spermatogenesis is initiated, as is also evident from the testicular weight and morphology. Other maximum values are not reached until the onset of puberty which occurs around 56 days of age.

The FSH serum levels are quite high already at an earlier time which is not directly correlated with the FSH binding capacities. LH and testosterone are distinctly increasing only during the peripubertal phase.

These investigations support the concept of FSH being essential at least for the initiation of spermatogenesis.

Estradiol benzoate as well as cyproterone acetate lead also to a decrease in FSH binding capacities which is associated with inhibition of spermatogenesis. Evidence is provided that the inhibition of spermatogenesis by the antiandrogen, cyproterone acetate, can be attributed to this mechanism. The reduced FSH binding capacity results in decreased production of ABP in the Sertoli cells and, thereby, in an androgen deficit within the seminiferous tubules which in turn causes derangement of spermatogenesis. The antigonadotropic activity of the antiandrogen might constitute an additional reason for the inhibition of spermatogenesis if higher doses are applied.

As concerns estrogens, a direct effect on Leydig cell function in the sense of reduced sensitivity towards LH has also to be discussed, in addition to the afore-mentioned mechanisms, as one of the reasons for inhibition of spermatogenesis.

There is evidence that probably all hormones, pharmaceuticals and noxes which inhibit spermatogenesis exert this effect, in the last analysis, primarily through interference with Sertoli cell function.

VI.

L I T E R A T U R

- Aschner, B.: Zitat nach H.E. Voss. In: Voss, H.E. und Oertel, G. "Androgen I". 39. Vers. Dtsch. Ges. f. Chir., Berlin 1910, pp 8 (1973)
- Balze, F.A. de la, Mancini, R.E., Bur, G.E., and Irazu, J.: Morphologic and histochemical changes produced by estrogens on adult human testes. Fertil. Steril. 5, 421 (1954)
- Berswordt-Wallrabe, R. von, and Neumann, F.: Failure to induce effects in the testes of hypophysectomized rats concomitantly treated with a FSH preparation and the anti-androgen, cyproterone acetate. Proc. 5th World Congr. Fertility Sterility (1966) Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 109 (Abstr. No. 227) Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 133, 581 (1967)
- Berswordt-Wallrabe, R., and Neumann, F.: Successful re-initiation and restoration of spermatogenesis in hypophysectomized rats with pregnant mare's serum after a long-term regression period. Experientia 24, 499 (1968)
- Boccabella, A.V.: Reinitiation and restoration of spermatogenesis with testosterone propionate and other hormones after a long-term post-hypophysectomy regression period. Endocrinology 72, 787 (1963)
- Bouin, P. et Ancel, P.: Sur la signification de la glande interstitielle du testicule embryonnaire. C.R. Soc. de Biol. (Paris) 55 (1903)
- Buroni, B.: Traitement de l'hypoplasie testiculaire des cryptorchides par greffe d'hormones sous l'albuginée. Presse méd. 59, 1687 (1951)

- Castro, A.E., Seigner, A.C., and Mancini, R.E.: Electron microscopic study of the localization of labeled gonadotropins in the sertoli and leydig cells of the rat testis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 133, 582 (1970)
- Castro, A.E., Alonso, A., and Mancini, R.E.: Localization of follicle-stimulating and luteinizing hormones in the rat testis using immunohistological tests. *J. Endocrinol.* 52, 129 (1972)
- Clermont, Y., and Harvey, S.C.: Effects of hormones on spermatogenesis in the rat. *Ciba Found. Colloq. Endocrinol.* 16, 173 (1967)
- Cutuly, E., and Cutuly, E.C.: Observations on spermatogenesis in rats. *Endocrinology* 26, 503 (1940)
- Dischreit, J.: Wirkung des Testikelhormonpräparates Erugon auf den juvenilen Rattenhoden. *Klin. Wschr.* 18, 1493 (1939)
- Döhler, K., and Wuttke, W.: Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocr.* 94, 1003 (1974)
- Fritz, I.B., Louis, B.G., Tung, P.S., Griswold, M., Rommerts, F.G., and Dorrington, J.H.:
In: French, F.S., Hansson, V., Ritzén, E.M. and Nayfeh, S.N. "Hormonal Regulation of Spermatogenesis", pp 367
New York: Plenum Press (1975)
- Fröhlich, W., and Schenck, B.: Effect of oestradiol-17 β on leydig cell function in rats. *Acta endocrinol. (Kbh.) Suppl.* 208, 58 (1977)
- Gaarenstroom, J.H.: Inhibition of the "antimasculine effect" of oestrone by testosterone propionate. *Acta brev. neerl. Physiol.* 2, 134 (1939)

- Gaarenstroom, J.H., and de Jongh, S.E.: A contribution to the knowledge of the influence of gonadotropic and sex hormones on the gonads of rats. Amsterdam: Elsevier, Ned. Akad. Wetenschappen Monograph (1946)
- Gadermann: Über androgene Substanzen. Hambg. Ärzteblatt 2, 235 (1950)
- Getzoff, P.L.: Clinical evaluation of testicular biopsy and the rebound phenomenon. Fertil. Steril. 6, 465 (1955)
- Goldman, B., Grazia, J.R., Kamberi, I.A., and Porter, J.C.: Serum gonadotropin concentrations in intact and castrated neonatal rats. Endocrinology 88, 771 (1971)
- Gospodorowicz, D.: Preparation and characterization of plasma membranes from bovine corpus luteum. J. Biol. Chem. 248, 5050 (1973)
- Gräf, K.J., Brotherton, J., and Neumann, F.: Clinical uses of antiandrogens (other than for hypersexuality and sexual deviation). In: Eichler, O., Farah, A., Herken, H., and Welch, A.D. (eds.) "Handbuch der experimentellen Pharmakologie", Band 35/2, Kap. VII, S. 485. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag (1974)
- Greene, R.R., and Burrill, M.W.: The recovery of testes after androgen-induced inhibition. Endocrinology 26, 516 (1940)
- Greenwood, F.C., Hunter, W.M., and Glover, J.C.: The preparation of ^{131}I -labeled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89, 114 (1963)
- Greep, R.O., Fevold, H.L., and Hisaw, F.L.: Effects of 2 hypophyseal gonadotropic hormones on reproductive system of male rat. Anat. Record 65, 261 (1936)

Greep, R.O., and Fevold, H.L.: The spermatogenic and secretory function of the gonads of hypophysectomized adult rats treated with pituitary FSH and LH. *Endocrinology* 21, 611 (1937)

Hagenäs, L., Plöen, L., and Ritzén, E.M.: Testicular androgen binding protein (ABP). Localization and site of production. *Endocrinology* (in press)

Hansson, V., Frensch, E., Trygstad, O., and Torgersen, O.: FSH-stimulation of testicular androgen binding protein (ABP). *Nature New Biology* 246, 56 (1973)

Hansson, V., Reusch, E., Trystad, O., Torgersen, O., Ritzén, E.M., and French, F.S.: Spermatogenesis - Effect of FSH on production of androgen-binding protein and subsequent change in spermatogenic activity. *Nature* 246, 56 (1973)

Hansson, V., French, F.S., Weddington, S.C., Nayfeh, S.N., and Ritzén, E.M.:
In: Dufau, M.L., and Means, A.R. (eds.) "Hormone Binding and Target Cell Activation of the Testis", pp 287,
New York: Plenum Press (1974)

Hansson, V., Trygstad, O., and Ritzén, E.M.: Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. *Nature* 250, 387 (1974)

Hansson, V., Ritzén, E.M., French, F.S., and Nayfeh, S.N.:
In: Hamilton, D.W., and Greep, R.O. (eds.) "Handbook of Physiology", p. 173,
Amer. Physiol. Soc., Vol. 5 (1975)

Hansson, V., Weddington, S.C., Naess, O., Attramadal, A., French, F.S., Kotite, N., Nayfeh, S.N., Ritzén, M., and Hagenäs, L.:
In: French, F.S., Hansson, V., Ritzén, E.M., and Nayfeh, S.N. (eds.) "Hormonal Regulation of Spermatogenesis", pp. 323
New York: Plenum Press (1975)

- Hansson, V., Purvis, K., Calandra, R., French, F.S.,
Kotite, N., Nayfeh, S.N., Ritzén, E.M., and Hagenäs, L.:
Proc. 5th Int. Congr. of Endocrin., Hamburg 18-24 July
(1976)
- Hansson, V., Ritzén, E.M., and French, F.S.:
In: Hafez, E.S.E. (ed.) "The Human Semen and Fertility
Regulation in the Male".
Moseby Publ. Company (in press. 1976)
- Hansson, V., and Ritzén, M.: Hormonal regulation of sperma-
togenesis. Institute of Pathology, Rikshospitalet, Oslo
(Norway) and Pediatric Endocrinology Unit, Karolinska
Sjukhuset Stockholm (Sweden).
Schoeller-Junkmann-Preis, 1-48 (1977)
- Hasan, S.H., Neumann, F., and Schenck, B.: Long-term effect
of cyproterone on testosterone levels in male rats.
Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 173, 19 (1973)
- Hasan, S.H.: Determination of androgens by competitive
protein. Binding method and radioimmunoassay.
In: Eichler, O., Farah, A., Herken, H. and Welch, A.D.
(eds.) "Handbook of Experimental Pharmacology", Volume
XXXV/2, pp. 22 - 48. Berlin - Heidelberg - New York:
Springer Verlag (1974)
- Heckel, N.J., and Steinmetz, C.R.: The effect of female sex
hormone on the function of the human testis. J. Urol.
46, 319 (1941)
- Heckel, N.J., Ross, O.W.A., and Kestel, L.: Spermatogenic
rebound phenomenon after administration of testosterone
propionate. J. clin. Endocr. 11, 235 (1951)
- Heckel, N.J., and Mc Donald, J.H.: The rebound phenomenon
of the spermatogenic activity of the human testis
following the administration of testosterone propionate;
further observations. Fertil. Steril. 3, 49 (1952 a)
- Heckel, N.J., and Mc Donald, J.H.: The effects of testosterone
propionate upon the spermatogenic function of the human
testis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 55, 725 (1952 b)

- Heller, C.G., Nelson, W.O., Hill, I.C., Henderson, E., Maddock, W.O., Jungck, E.C., Paulsen, C.A., and Mortimore, G.D.: Improvement in spermatogenesis following depression of human testes with testosterone. *Fertil. Steril.* 1, 415 (1950 a)
- Heller, C.G., Nelson, W.O., Hill, I.C., Henderson, E., Maddock, W.O., and Jungck, E.C.: The effect of testosterone administration upon the human testis. *J. Clin. Endocr. Metab.* 10, 816 (1950 b)
- Herchen, H.: Quantitative Untersuchungen über die Plasmarrückbildung und Plasmaentfaltung der Leydigzellen des Rattenhodens in Abhängigkeit vom Grad der Gonadotropin-stimulierung. *Endokrinologie* 31, 184 (1954)
- Hohlweg, W.: Die Wirkung von Testosteron auf die Spermio-genese im Sinne eines Gewebshormons. In: Nowakowski, H. (ed.) "Gewebs- und Neurohormone - Physiologie des Melanophorenhormons", pp. 135. 8. Symp. Dtsch. Ges. f. Endokrinologie, München 1961. Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag (1962)
- Hohlweg, W., und Junkmann, K.: Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens. *Klin. Wschr.* 11, 321 (1932)
- Hohlweg, W. und Zahler, H.: Über die Wirkung der Einpflanzung von Testosteron in den Hoden infantiler und hypophysektomierter Ratten. *Z. ges. inn. Med.* 1, 42 (1946)
- Hohlweg, W., Dörner, G. und Kopp, P.: Über die Wirkung intratestikulärer Testosteronimplantationen auf Sexualverhalten und Fertilität oestrogenbehandelter Rattenmännchen. *Acta endocr. (Kbh.)* 36, 299 (1961)
- Horn, H.-J.: Die Behandlung von Sexualdelinquenten mit Cyproteronacetat. In: Raspé, G. (ed.) Schering Symposium über "Sexualdeviationen und ihre medikamentöse Behandlung", Berlin 1971. *Life Sci. Monogr.* 2, 113 (1972)
Oxford - Edinburgh - New York: Pergamon Press - Vieweg

- Hotchkiss, R.S.: Effects of massive doses of testosterone propionate upon spermatogenesis. *J. Clin. Endocrin.* 4, 117 (1944)
- Jaggard, J., and Bradbury, J.T.: Local and systemic effects of intratesticular testosterone and estradiol pellets in immature rats. *Endocrinology* 68, 759 (1961)
- Koch, U.J., Lorenz, F., Danehl, K., Ericsson, R., Hasan, S.H., von Keyserlingk, D., Lübke, K., Mehring, M., Römmeler, A., Schwartz, U., and Hammerstein, J.: Continuous oral low-dosage cyproterone acetate for fertility regulation in the male? A trend analysis in 15 volunteers. *Contraception* 14, 117 (1976)
- Leatham, J.H.: Effect of testosterone propionate on spermatogenesis in hypophysectomized rats following the injection of gonadotrophins. *Anat. Rec.* 83, 579 (1942)
- Leatham, J.H.: Influence of testosterone propionate on the adrenals and testes of hypophysectomized rats. *Anat. Rec.* 89, 155 (1944)
- Leblond, C.P., Steinberger, E., and Roosen-Runge, E.C.: In: Hartman, G. (ed.) "Mechanism concerned with conception", Chapt. 1, p. 1, Oxford: Pergamon Press (1963)
- Lostroh, A.J.: Effect of follicle-stimulating hormone and interstitial cell-stimulating hormone on spermatogenesis in Long-Evans rats hypophysectomized for six months. *Acta endocr. (Kbh.)* 46, 592 (1963)
- Lostroh, A.J.: Regulation by FSH and LH of reproductive function in the immature male rat. *J. Endocrinology* 85, 438 (1970)
- Ludwig, D.J.: The effect of androgen on spermatogenesis. *Endocrinology* 46, 453 (1950)
- Lynch, K.M. jr.: Recovery of the rat testis following estrogen therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55, 734 (1952)

- Mancini, R.E., Castro, A., and Seigner, A.C.: Histologic localization of follicle stimulating and luteinizing hormones in the rat testis. J. Histochem. Cytochem. 15, 516 (1967)
- Means, A.R.: Early effects of FSH upon testicular metabolism. Adv. Exptl. Biol. Med. 10, 301 (1970)
- Means, A.R.: Concerning the mechanism of FSH action: rapid stimulation of testicular synthesis of nuclear RNA. Endocrinology 89, 981 (1971)
- Means, A.R.: Concerning the testicular actions of FSH on cells of the seminiferous epithelium. In: Proceedings of the Third Pan American Congress of Anatomy, New Orleans, 1972. New Orleans: Pan Am. Congr. Anat., p. 385 (1972)
- Means, A.R.: Metabolic effects of FSH on cells of the seminiferous tubules. In: Mancini, R. (ed.) "Male Fertility and Sterility". New York: Acad. Press (1974)
- Means, A.R.: Biochemical effects of follicle-stimulating hormone on the testis. In: Hamilton, D.W., and Greep, R.O. (eds.) "Handbook of Physiology", Vol. V, p. 203-218, Washington: American Physiological Society (1975)
- Means, A.R.: Specific interaction of ^3H -FSH with rat testis binding sites. Adv. Exptl. Med. Biol. 36, 431 (1973)
- Means, A.R., and Hall, P.F.: Effect of FSH on protein biosynthesis in the testes of the immature rat. Endocrinology 81, 1151 (1967)
- Means, A.R., and Hall, P.F.: Protein biosynthesis in the testis. II. Role of adenosine triphosphate (ATP) in stimulation by glycose. Endocrinology 83, 86 (1968)
- Means, A.R., and Hall, P.F.: Protein biosynthesis in the testis. I. Comparison between stimulation by FSH and glucose. Endocrinology 82, 597 (1968)

- Means, A.R., Hall, P.F., Nicol, L.W., Sawyer, W.H., and Baker, C.A.: Protein biosynthesis in the testis. IV. Isolation and properties of polyribosomes. *Biochemistry* 8, 1488 (1969)
- Means, A.R., and Hall, P.F.: Protein biosynthesis in the testis. V. The nature of stimulation by follicle-stimulating hormone. *Biochemistry* 8, 4293 (1969)
- Means, A.R., and Hall, P.F.: Protein biosynthesis in the testis. VI. Action of follicle-stimulating hormone on polyribosomes in immature rats. *Cytobios* 3, 17 (1971)
- Means, A.R., and Vaitukaitis, J.: Peptide hormone receptors; specific binding of ^3H -FSH to testis. *Endocrinology* 90, 39 (1972)
- Means, A.R., McDougall, E., Soderling, T.R., and Corbin, J.D.: Testicular adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases: regulation by follicle stimulating hormone. *J. Biol. Chem.* 249, 1231 (1974)
- Means, A.R., and Huckins, C.: In: Dufau, M.L., and Means, A.R. (eds.) "Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis", pp 145. New York: Plenum Press (1974)
- Means, A.R., and Tindall, D.J.: In: French, F.S., Hansson, V., Ritzén, E.M., and Nayfeh, S.H. (eds.) "Hormonal Regulation of Spermatogenesis", pp 383. New York: Plenum Press (1975)
- Moore, C.R., and Price, D.: Gonad hormone function, and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex hormone antagonism. *Amer. J. Anat.* 50, 13 (1932)
- Morse, H.C., Leach, D.R., Rowley, M.J., and Heller, C.G.: Effect of cyproterone acetate on sperm concentration, seminal fluid volume, testicular cytology and levels of plasma and urinary ICSH, FSH and testosterone in normal men. *J. Reprod. Fertil.* 32, 365 (1973)

- Mulder, E., Brinkmann, A.O., Lamers-Stahlhofen, G.,
Mechielsen, M.J., and van der Molen, H.J.:
FEBS Lett. 31, 131 (1973)
- Mulder, E., van Beurden-Lamers, W.M.O., de Boer, W.,
Brinkmann, A.O., and van der Molen, H.J.:
In: Dufau, M.L., and Means, A.R. (eds.) "Hormone Binding
and Target Cell Activation in the Testis", pp 343.
New York: Plenum Press (1974)
- Murphy, H.D.: Sertoli cell stimulation following intra-
testicular injection of FSH in the hypophysectomized rat.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 118, 1202 (1965)
- Nelson, W.O.: Renewal of sperm formation in hypophysecto-
mized rats. Anat. Rec. 79, 48 (Abstr.) (1941)
- Nelson, W.O., and Merckel, C.: Maintenance of spermatogenesis
in testis of the hypophysectomized rat with sterol deri-
vatives. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 36, 825 (1937)
- Neumann, F.: Antagonismus von Testosteron und 1,2 α -Methylen-
6-chlor-pregna-4,6-dien-17-ol-3,20-dion (Cyproteron) an
den die Gonadotropinsekretion regulierenden Zentren bei
männlichen Ratten. Acta endocr. (Kbh.) 53, 382 (1966)
- Neumann, F.: Wirkung eines Androgen-Antagonisten auf die
Struktur der Hypophysenvorderlappenzellen von männlichen
Ratten. 12. Symposium der Dtsch. Ges. f. Endokrinologie,
Wiesbaden 1966, pp 308.
Berlin: Springer Verlag (1967)
- Neumann, F., Kramer, M. und Junkmann, K.: Tierexperimentelle
Untersuchungen mit 17 α -Aethinyl-19-nor-Testosteronacetat.
Suppl. ad "Medicina Experimentalis" 11 (1964)
- Neumann, F., Richter, K.-D. und Günzel, P.: Wirkung von
Antiandrogenen. Zbl. Vet. med., Reihe A, 12, 171 (1965)

- Neumann, F. und von Berswordt-Wallrabe, R.: Ansprechbarkeit der Gonaden hypophysektomierter männlicher und weiblicher Ratten auf extrahypophysäre gonadotrope Hormone nach einjähriger Involutionsperiode. 12. Symp. Dtsch. Ges. f. Endokrinologie, Wiesbaden 1966, S. 328.
Berlin: Springer Verlag (1967)
- Neumann, F., and von Berswordt-Wallrabe, R.: Abolishing effect of an androgen-antagonist on the steroid induced inhibition of ovulation in rats. Fifth World Congress of Fertility and Sterility, Stockholm 1966.
Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 109 (Abstr. No. 32)
Excerpta Med. Int. Congr. Ser. 133, 129 (1967)
- Neumann, F., Steinbeck, H., und von Berswordt-Wallrabe, R.: Untersuchungen zur spermatogenen Aktivität von Gestagenen. Endocrinologia 52, 54 (1967)
- Neumann, F., Elger, W., Steinbeck, H. und von Berswordt-Wallrabe, R.: Antiandrogene. In: Klein, E. (ed.) "Das Testosteron - Die Struma", S. 78
13. Symp. Dtsch. Ges. für Endokrinologie, Würzburg 1967.
Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag (1968)
- Neumann, F., and Steinbeck, H.: Antiandrogens.
In: Eichler, O., Farah, A., Herken, H., and Welch, A.D. (eds.) "Handbook of Experimental Pharmacology", Volume XXXV/2, pp. 235-484. Berlin - Heidelberg- New York: Springer Verlag (1974)
- Neumann, F. und Schenck, B.: Endokrinpharmakologie - Pharmakotherapie mit Hormonen. In: Forth, W., Henschler, D. und Rummel, W. (Hrsgb.) "Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie" (Lehrbuch), S. 304-352. Mannheim - Wien - Zürich: Bibliographisches Institut (1975)

- Neumann, F., Diallo, A., Hasan, S.H., Schenck, B., and Traoré, I.: The influence of pharmaceutical compounds on male fertility. Kleinkonferenz der Deutschen Forschungsgemeinschaft "Male Reproduction with Special Reference to Human Infertility", Schloß Auel, Wahlscheid, Mai 1975. *Andrologia* 8, 203 (1976)
- Neumann, F., Gräf, K.-J., Hasan, S.H., Schenck, B., and Steinbeck, H.: Action of antiandrogens on testes function and the male genital tract. In: Hubinont, P.O. (ed.) "Sperm Action. Progress in Reproductive Biology", Vol. 1, pp 268. Fifth International Seminar on Reproductive Physiology and Sexual Endocrinology, Brussels, May 1975. Basel: S. Karger Verlag (1976)
- Ojeda, S.R., and Ramirez, V.D.: Plasma LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology* 90, 466 (1972)
- Ott, F.: Hypersexualität, Antiandrogene und Hodenfunktion. *Praxis* 57, 218 (1968)
- Ott, F. und Hoffet, H.: Beeinflussung von Libido, Potenz und Hodenfunktion durch Antiandrogene. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 98, 1812 (1968)
- Pallos, K.V.: Über den Einfluß längere Zeit hindurch verabreichter großer Mengen natürlicher und synthetischer oestrogener Stoffe auf die Hoden erwachsener männlicher Ratten. *Arch. Gynaekol.* 171, 471 (1941)
- Papkoff, H., and Ekbal, M.: Ovine follicle stimulating hormone-preparation and characterization of its subunits. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 40, 614 (1970)
- Parlow, A.F., Daone, T.A., and Dignam, W.J.: On the concentration of radioimmunoassayable FSH circulating in blood throughout human pregnancy. *J. Clin. Endocr.* 31, 213 (1970)

- Petry, R., Mauss, J., Rausch-Stroomann, J.-G., and Vermeulen, A.: Reversible inhibition of spermatogenesis in men. *Horm. Metab. Res.* 4, 386 (1972)
- Pfeiffer, C.A.: Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads. *Amer. J. Anat.* 58, 195 (1936)
- Raspé, G.: Schering Symposium über Sexualdeviationen und ihre medikamentöse Behandlung, Berlin 1971.
Life Sciences Monographs 2, Oxford - Edinburgh - New York: Pergamon Press - Vieweg (1972)
- Reichert, L. jr., and Bhalla, V.K.: Development of a radio-ligand tissue receptor assay for human follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 94, 483 (1974)
- Rössle, R. und Zahler, H.: Experimentelle Untersuchungen über Hoden- und Prostataveränderungen durch Zufuhr von Hoden-wirkstoffen. *Virchows Arch. path. Anat.* 302, 251 (1938)
- Rubinstein, H.S., and Kurland, A.A.: The effect of small doses of testosterone propionate on the testis and accessory sex organs. *J. Urol.* 45, 780 (1941)
- Samuel, L.T., and Eik-Nes, K.B.: Metabolism of steroid hormones. *Greenberg Metabolic Pathway Vol. II*, 3. Ed., 169 (1968)
- Sar, M., Stumpf, W.E., McLean, W.S., Smith, A.A., Hansson, V., Nayfeh, S.N., and French, F.S.:
In: French, F.S., Hansson, V., Ritzén, E.M., and Nayfeh, S.N. (eds.) "Hormonal Regulation of Spermatogenesis", p. 311, New York: Plenum Press (1975)
- Schenck, B., and Neumann, F.: Inhibition of spermatogenesis by the antiandrogen cyproterone acetate (CA): Mechanism of action. *V. Intern. Congr. of Endocrinology, Hamburg, Fed. Rep. Germany, July 18 - 24* (1976).
Abstracts of short communications and poster presentations, p. 233

- Schennetten, F.: Über die Wirkung einer Testosteronkristall-implantation in den Hoden eines 18-jährigen infantilen Menschen. Z. ges. inn. Med. 3, 696 (1948)
- Schneider, J.A. und Hohlweg, W.: Über die Möglichkeit einer intratestikulären Verabreichung von Testosteron-Kristall-Emulsionen. Z. ges. inn. Med. 5, 412 (1950)
- Schoeller, W., Dohrn, M. und Hohlweg, W.: Die Überlegenheit des weiblichen Hormons in seiner Wirkung auf die männliche und weibliche Kastratenhypophyse gegenüber männlichen Hormonen. Klin. Wschr. 15, 1907 (1936)
- Schuermann, H.: Intratestale Androgenapplikation bei schweren Fertilitätsstörungen. Klin. Wschr. 29, 201 (1951)
- Schwartz, M.: Effect of stilbestrol on testis and breast of patients treated for carcinoma of prostate gland. Proc. Am. Fed. Clin. Res. 2, 97 (1945)
- Seitz, W.: Über die Implantation von Testosteron-Presslingen in den menschlichen Hoden und die dadurch erreichte Entwicklung des Keimepithels. Klin. Wschr. 27, 601 (1949)
- Selye, H.: Interactions between various steroid hormones. Canad. med. Ass. J. 42, 113 (1940)
- Selye, H., and Friedman, S.M.: The action of various steroid hormones on the testis. Endocrinology 28, 129 (1941)
- Senge, Th., Neumann, F. und Richter, K.D. (eds.) Physiologie und Pathologie der Prostata, S. 24 - 45, Arbeitstagung in Cantstein (Sauerland), Mai 1974. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1975)
- Smith, P.E.: Hypophysectomy and a replacement therapy in the rat. Am. J. Anat. 45, 205 (1930)
- Smith, P.E.: Comparative effects of hypophysectomy and therapy on the testes of monkeys and rats. In: Brouha, L. (ed.) "Les Hormones Sexualis", Paris (1938)
- Steinberger, A.: Relationship between the yield of spermatoocytes in rat testes organ culture and age of the donor animal (Abstr.) Anat. Record 157, 327 (1967)

- Steinberger, E.: In: French, F.S., Hansson, V., Ritzén, E.M., and Nayfeh, S.N. (eds.) "Hormonal Regulation of Spermatogenesis", pp 337. New York: Plenum Press (1975)
- Steinberger, E., and Nelson, W.O.: Effect of hypophysectomy, cryptorchidism, estrogen and androgen upon the level of hyaluronidase in the rat testis. *Endocrinology* 56, 429 (1955)
- Steinberger, E., and Duckett, G.E.: The effect of estrogen or testosterone on initiation and maintenance of spermatogenesis in the rat. *Endocrinology* 76, 1184 (1965)
- Steinberger, A., and Steinberger, E.: Differentiation of rat seminiferous epithelium in organ culture. *J. Reprod. Fertility* 2, 243 (1965)
- Steinberger, A., and Steinberger, E.: Stimulatory effect of vitamins and glutamine on the differentiation of germ cells in rat testes organ culture grown in chemically defined media. *Exptl. Cell Res.* 44, 429 (1966)
- Steinberger, E., and Duckett, G.E.: Hormonal control of spermatogenesis. *J. Reprod. Fertility Suppl.* 2, 75 (1967)
- Steinberger, A., and Steinberger, E.: Factors affecting spermatogenesis in organ cultures of mammalian testes. *J. Reprod. Fertility Suppl.* 9, 117 (1967)
- Steinberger, E., and Steinberger, A.: The spermatogenic function of the testes. In: McKerns, L.W. (ed.) "The Gonads", pp 715. New York: Appleton-Century-Crofts, Meredith Corporation (1969)
- Steinberger, A., Elkington, J.S.H., Sanborn, B.M., Steinberger, E., Heindel, J.J., and Lindsey, J.N.: In: French, F.S., Hansson, V., Ritzén, E.M., and Nayfeh, S.N. (eds.) "Hormonal Regulation of Spermatogenesis", pp 399. New York: Plenum Press (1975)
- Stumpf, W.E.: Nuclear concentration of ^3H -estradiol in target tissues: 3-mount autoradiography of vagina, oviduct, mammary tumor, liver and adrenal. *Endocrinology* 85, 31 (1969)

- Swerdloff, R.S., Walsh, P.C., Jacobs, H.S., and Odell, W.D.:
Serum LH and FSH during sexual maturation in the male
rat; effect of castration and cryptorchidism.
Endocrinology 88, 120 (1971)
- Tonutti, E.: 1. Symp. Dtsch. Ges. f. Endokrinologie,
Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer Verlag (1955)
- Tonutti, E., Weller, O., Schucharth, E. und Heinke, E.:
Die männliche Keimdrüse. Struktur - Funktion - Klinik.
Stuttgart: Georg Thieme Verlag (1960)
- Traore, I.: Untersuchungen zur Bedeutung des FSH für die
Sertolizellfunktion - FSH-Bindungskapazität im Hoden
von Ratten beim experimentellen Kryptorchismus, nach
Hypophysektomie, nach Bestrahlung und Behandlung mit
Cadmiumchlorid. Dissertation 1977 (im Druck)
- Vaitukaitis, J.L., Hammond, J., Sherius, R., Ross, G.T.,
Hickman, J., and Ashwell, G.: A method for the prepa-
ration of radioactive FSH with preservation of biologic
activity. *Endocrinology* 89, 1356 (1971)
- Van Wagenen, G., and Simpson, M.E.: Testicular development
in the rhesus monkey. *Anat. Rec.* 118, 231 (1954)
- Walsh, E.L., Cuyler, W.K., and McCullagh, D.R.: The physio-
logic maintenance of the male sex glands; the effect of
androtin on hypophysectomized rats. *Amer. J. Physiol.*
107, 508 (1937)
- Wells, L.J.: The response of the testis to androgens
following hypophysectomy. *Anat. Rec.* 82, 565 (1942)

- Woods, M.C., and Simpson, M.E.: Pituitary control of the testis of the hypophysectomized rat. *Endocrinology* 69, 91 (1961)
- Yasuda, M., and Johnson, D.C.: Effects of exogenous androgen and gonadotropins on the testes and hypophyseal follicle-stimulating hormone content of the immature male rat. *Endocrinology* 76, 1033 (1965)
- Zahler, H.: Die Auffrischung greisenhafter Hunde mittels Hodenwirkstoffen und ihre Auswirkung auf Hoden und Prostata. *Virchows Arch. path. Anat.* 305, 65 (1939)
- Zahler, H.: Über die Wirkung verschiedener Gaben von Androgenen auf den Rattenhoden. *Virchows Arch. path. Anat.* 312, 138 (1944)
- Zahler, H.: Über die Wirkung verschiedener Gaben von Testosteronpropionat auf infantile Rattenhoden. *Virchows Arch. path. Anat.* 314, 23 (1947 a)
- Zahler, H.: Über das Verhalten der Hoden und Hypophysen A-vitaminotischer Ratten und ihre Beeinflußbarkeit durch androgenen Wirkstoff. *Virchows Arch. path. Anat.* 314, 45 (1947 b)

VII.

LEBENS LAUF

Am 21. Oktober 1947 wurde ich, Alpha Mamadou Diallo, als Sohn des Landwirts Mamadou Oury Diallo und seiner Ehefrau Oumou Diallo, in Sanno -Labé (Guinea) geboren.

Von 1953 bis 1959 besuchte ich die Grundschule meiner Kreishauptstadt.

Von 1959 bis 1966 besuchte ich das Gymnasium von Conakry (Lycée classique et moderne de Donka), wo ich meine Schulzeit mit dem Abitur abschloß.

Im Oktober 1966 kam ich nach Leipzig, wo ich - nach einer 2-semesterigen Sprachausbildung am Herder-Institut - mit dem Studium der Tiermedizin an der Karl-Marx-Universität begann.

Die tierärztliche Prüfung legte ich im Juni 1972 ab.

Vom September 1972 bis September 1973 war ich als Assistententierarzt tätig.

Seit November 1973 bin ich Doktorand bei der Firma Schering AG (Department für Endokrinpharmakologie) bzw. an der Freien Universität Berlin.

Vom Januar bis Oktober 1976 nahm ich an dem 13. Seminar für Tropen-Veterinär-Medizin an der Freien Universität Berlin teil.

VIII.

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. F. Neumann gilt mein Dank für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung, die ich von ihm erhalten habe sowie für die Hilfe bei der Abfassung des Manuskriptes.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern des Departments Endokrinpharmakologie der Firma Schering AG für die jederzeit gewährte Unterstützung, insbesondere Herrn Dr. Hasan, Herrn E. Friedreich und Fräulein B. Sperling.

Dank schulde ich auch der Firma Schering AG Berlin/Bergkamen für die Gewährung eines Stipendiums.

